

Expression von Wachstumsfaktoren (z.B. bone morphogenetic proteins),
Matrixmolekülen und Entzündungsmediatoren in der Bursa subacromialis bei
periartikulären Schultererkrankungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)
vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Amanda Eckert-Veit, geboren am 10.06.1981 in Freiberg

Gutachter:

Herr Prof. Dr. R. W. Kinne

Klinik/Institut für Orthopädie Universitätsklinikum Jena Waldkrankenhaus "Rudolf Elle"

Herr Prof. Dr. G. Matziolis

Klinik/Institut für Orthopädie Universitätsklinikum Jena Waldkrankenhaus "Rudolf Elle"

Herr Prof. Dr. R. Oberbeck

Muskuloskelettales Zentrum mit der Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädie
und der Klinik für Wirbelsäulenchirurgie
SRH Wald-Klinikum Gera gGmbH

Tag der öffentlichen Verteidigung:

04.02.2014

gewidmet

meiner Familie

I Abkürzungen

Abb.	Abbildung
a.d.	aqua destillata (destilliertes Wasser)
ALP	Alkalische Phosphatase
ANV	Akutes Nierenversagen
bp	Basenpaare
BMP	Bone Morphogenetic Protein
b-FGF	β -Fibroblast Growth Factor
CD	Cluster Designation
CT	Computertomographie
cDNA	copy DNA
DNA	Desoxyribonucleinsäure
CrP	C-reaktives Protein
ESWT	Extrakorporale Stoßwellen Therapie
EthBr	Ethidium Bromid
EZM	Extrazelluläre Matrix
H&E	Hämatoxylin-Eosin
IL-1 β	Interleukin 1 β
k.A.	keine Angabe
Kol	Kollagen
Lig.	Ligamentum
mRNA	Messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NSAR	Nicht Steroidale Antirheumatika
OSF	Osteoblastenspezifischer Faktor
PFA	Paraformaldehyd
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RA	Rheumatoide Arthritis
rER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
RM	Rotatorenmanschette
RNA	Ribonucleinsäure

Rnase	Ribonuklease
SSP	Supraspinatussehne
TBE	Tris-Bor-EDTA
	Ethylendiamintetraessigsäure
TBS	Tris Buffered Saline
TGF- β	Tissue Growth Factor- β
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
US	Ultraschall
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

I.I. verwendete Einheiten

A	Ampère
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
min	Minute
rpm	Rounds per Minute (Umdrehungen in der Minute)
sec	Sekunde
U	Spannung
V	Volt

I.II. Präfixe

k	Kilo
m	mili
μ	mikro
n	nano
p	piko

II Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Bursa subacromialis von ventral und dorsal

Abbildung 2: Kompression der Bursa subacromialis bei Abduktion

Abbildung 3: Bursa subacromialis im Längsschnitt

Abbildung 4: Rotatorenmanschette von dorsal und ventral

Abbildung 5: knöcherne Anatomie des Schultergelenkes

Abbildung 6: RM-Rupturformen nach Neer und Synder

Abbildung 7: Formen der kompletten RM-Ruptur

Abbildung 8: Kalkdepot bei einer Tendinitis calcarea

Abbildung 9: Mesenchymale Differenzierung

Abbildung 10: Molekülstruktur von BMP -2

Abbildung 11: Molekülstruktur von BMP -7

Abbildung 12: Längsschnitt und Teilbereiche der Bursa subacromialis

Abbildung 13: Verkalkungsgrade röntgenologisch (ap Aufnahme)

Abbildung 14: Lage der Bursa subacromialis und ein HE-Schnitt der Bursa subacromialis

Abbildung 15: Bursa trochanterica

Abbildung 16: Kapsel-Bereich

Abbildung 17: Bindegewebsstruktur der einzelnen Bursaabschnitte

Abbildung 18: vermehrtes Auftreten von Gefäßstrukturen

Abbildung 19: Drüsenstrukturen acromionnah und Drüsenstrukturen zentral

Abbildung 20: Auftreten von Fettvakuolen

Abbildung 21: sehnenähnliche Strukturen acromionfern

Abbildung 22: PCR-Analyse einer gesunden Synovialmembran mit Mittelwerten und Standardfehlern der mRNA-Expressionen für die einzelnen Gene

Abbildung 23: PCR-Analyse in der gesamten Bursa subacromialis mit Mittelwerten und Standardfehlern der mRNA-Expressionen für einzelnen Gene

Abbildung 24a: PCR-Analyse der Kollagene und von Aggrecan in der gesamten Bursa subacromialis im Vergleich zur gesunden Synovialmembran

Abbildung 24b: PCR-Analyse der Kollagene und von Aggrecan in den einzelnen Bereichen der Bursa und im Vergleich zur gesunden Synovialmembran Expressionsmuster

Abbildung 25a: Expressionsmuster der Wachstumsfaktoren in der VG Synovialmembran und der gesamten Bursa subacromialis

Abbildung 25b: PCR-Analyse der Wachstumsfaktoren in den einzelnen Bereichen der Bursa und im Vergleich zur gesunden Synovialmembran

Abbildung 26a: PCR-Analyse der Entzündungsfaktoren in der gesamten Bursa subacromialis im Vergleich zur gesunden Synovialmembran

Abbildung 26b: PCR-Analyse der Entzündungsfaktoren in den einzelnen Bereichen der Bursa und im Vergleich zur gesunden Synovialmembran

Abbildung 27a: Darstellung von Kollagen I-Protein mittels Immunhistochemie im zentralen Abschnitt

Abbildung 27b: Darstellung von Kollagen I-Protein mittels Immunhistochemie im acromionfernen Bereich

Abbildung 28: Darstellung Kollagen II- Protein im zentralen und acromionfernen Abschnitt

Abbildung 29: Darstellung von Kollagen X-Protein acromionnah und acromionfern

Abbildung 30: Darstellung von BMP-2 Protein acromionnah und zentral

Abbildung 31: Darstellung von BMP-7 Proteinacromionnah und zentral

Abbildung 32: Aktivität von Alkalischer Phosphatase in den einzelnen Bereichen der Bursa subacromialis

Tabelle 1: BMP-Untergruppen nach Wozney JM 2002

Tabelle 2: Patientenübersicht

Tabelle 3: für die PCR-Reaktion eingesetzten Primer

Tabelle 4a: Zusammenfassung der Krankheitsbilder

Tabelle 4b: Zusammenfassung der betroffenen Muskeln und Ursachen

Tabelle 5: Altersverteilung bei RM-Rupturen

Tabelle 6: erhobene Verkalkungsgrade

Tabelle 7: Frequenz der Verkalkungsgrade bei RM-Rupturen

Tabelle 8: Quantifizierung der definierten histologischen Kriterien in den einzelnen Bereichen der Bursa subacromialis

Tabelle 9: Lokalisation der Proteine sowie der Nachweis der Aktivität der Alkalischen Phosphatase in den einzelnen Bereichen der Bursa subacromialis

III Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungen	I
I.I.	verwendete Einheiten	I
I.II.	Präfixe	II
II	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	III
III	Inhaltsverzeichnis	V
1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	3
2.1.	Aufbau und Funktion der Bursa subacromialis	3
2.2.	Aufbau und Funktion der Rotatorenmanschette	6
2.3.	Periartikuläre Krankheitsbilder	7
2.3.1.	Das Impingementsyndrom	8
2.3.2.	Rupturen der Rotatorenmanschette	9
2.3.3.	Tendinitis calcarea	13
2.3.4.	Bursitis subacromialis	15
2.3.5.	Fibröse Schultersteife (Frozen shoulder)	16
2.4.	Die Pathophysiologie der Rotatorenmanschettendegeneration: Chondrogene Metaplasie	17
2.5.	Die mikrostrukturelle und qualitative Zusammensetzung der RM	18
2.5.1.	Die Kollagene	18
2.5.1.1.	Kollagen I	19
2.5.1.2.	Kollagen II	20
2.5.1.3.	Kollagen III	20
2.5.1.4.	Kollagen X	21
2.5.2.	Die Proteoglykane	21
2.6.	Die Wachstumsfaktoren mit Einfluss auf die RM	22
2.6.1.	TGF- β	22
2.6.2.	Bone Morphogenetic Proteins	23
2.6.2.1.	BMP -2	26
2.6.2.2.	BMP - 7	27
2.6.3.	b-FGF	28
2.6.4.	VEGF	29
2.7.	Proentzündliche Faktoren	30
2.7.1.	IL-1 β	30
2.7.2.	TNF- α	31
3.	Problemstellung	32

4. Materialien und Methoden	33
4.1. Materialien	33
4.1.1. Laborgeräte und allgemeiner Laborbedarf	33
4.1.2. Chemikalien	34
4.1.3. Enzyme und Proteine	34
4.1.4. Farbstoffe	35
4.1.5. Antikörper	35
4.1.6. Test-Kit	35
4.1.7. Herstellung von Puffern und Lösungen	36
4.1.8. Computersoftware	36
4.2. Methoden	37
4.2.1. Entnahme der Präparate	37
4.2.1.1 Entnahme der Bursa subacromialis	37
4.2.1.2 Entnahme von synovialen Gewebe	40
4.2.2. Histologische Auswertung	40
4.2.2.1. Herstellung und Vorbehandlung von Gewebeschnitten	40
4.2.2.2. Färbung	40
4.2.2.3. Immunhistochemie	41
4.2.2.4. Enzymhistochemie	42
4.2.3. Auswertung der histologischen Schnitte	43
4.2.4. Polymerasekettenreaktion	44
4.2.4.1. RNA-Isolierung	44
4.2.4.2. Reverse Transkription	45
4.2.4.3. Polymerasekettenreaktion	45
4.2.4.4. Auswertung der PCR	47
4.2.5. Auswertung der konventionellen Röntgenbilder	47
4.2.6. Statistische Auswertung	48
5. Ergebnisse	49
5.1. Klinische Ergebnisse	49
5.2. Histologische Ergebnisse	51
5.3. Ergebnisse der PCR	55
5.3.1. Ergebnisse der Vergleichsgruppe	55
5.3.2. Ergebnisse der Bursa subacromialis-Proben	56
5.4. Immunhistochemische und enzymhistochemische Ergebnisse	62
5.4.1. Die Kollagene	62
5.4.2. BMP-2 und BMP-7	64
5.4.3. Nachweis der alkalischen Phosphatase	66

6. Diskussion	67
6.1. Begründung für die detaillierte Untersuchung verschiedener Regionen der pathologisch veränderten Bursa subacromialis	67
6.2. Klinische Ergebnisse	68
6.3. Pathologische Veränderungen in der Bursa subacromialis	72
6.4. Chondroide Metaplasie im acromionnahen Bereich der Bursa subacromialis:	
Expression- und Funktion der Wachstumsfaktoren	74
6.4.1. bFGF	74
6.4.2. TGF- β	75
6.4.3. BMP -2 und BMP -7	75
6.4.4. VEGF	76
6.5. Verteilung der Kollagene/Expression der EZM	77
6.5.1. Kollagen I	77
6.5.2. Kollagen II und Aggrecan	78
6.5.3. Kollagen III	79
6.5.4. Kollagen X	79
6.6. Expression der Entzündungsfaktoren	80
6.7. Pro und Contra bezüglich der Bursektomie bei operativer Versorgung periartikulärer Schultererkrankungen	82
7. Schlußfolgerung	85
8. Literatur	87
9. Anhang	102
9.1. Ehrenwörtliche Erklärung	102
9.2. Lebenslauf	103
9.3. Danksagung	104

1. Zusammenfassung

Periartikuläre Schultererkrankungen haben in den Industrienationen eine hohe Prävalenz (6,6 – 25%) und führen wegen der Begleitschmerzen und Bewegungseinschränkungen zu einem hohen Leidensdruck. Zu diesen Schultererkrankungen zählen in absteigender Häufigkeit Rupturen der Rotatorenmanschette (RM), Impingementsyndrom, Tendinitis calcarea und vordere Schulterinstabilität. Trotz Verbesserung von Diagnose und operativer Therapie der RM-Ruptur sind Komplikationen im Heilungsverlauf bzw. Re-Rupturen häufig. Als Ursachen der o. a. Schultererkrankungen werden verschiedene extrinsische (z.B. Traumata oder knöcherne Einengungen des Subacromial-Raums) und intrinsische Faktoren (Alterungs- oder Degenerationsprozesse) diskutiert, die Pathogenese ist jedoch noch unvollständig geklärt. Die Bursa subacromialis ist bei diesen Erkrankungen entzündlich bzw. degenerativ verändert und könnte durch die lokale Expression von Entzündungsmediatoren sowie verschiedenen Wachstumsfaktoren und Kollagenen pathogenetisch relevant sein und degenerative Veränderungen in den Sehnen der Rotatorenmanschette fördern.

Um das entzündliche/degenerative Potential der Bursa subacromialis in den o. g. Erkrankungen zu untersuchen, wurden die resezierten Bursae makroskopisch und histologisch bewertet. Weiterhin wurde die mRNA-Expression bestimmter Entzündungs- (IL-1 β und TNF- α) und Wachstumsfaktoren (BMP-2/-7, bFGF und TGF- β) bzw. Matrixmoleküle (Kollagen I, II, III und X sowie Aggrecan) analysiert. Im Fokus stand dabei die chondroide Metaplasie als ein von der Bursa ausgehender pathogenetischer Ansatz periartikulärer Erkrankungen.

In der aktuellen Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, ob es bei periartikulären Schultererkrankungen Anzeichen einer Entzündung bzw. chondroiden Metaplasie in der Bursa subacromialis gibt und ob die chondroide Metaplasie evt. eine Rolle in der Pathogenese periartikulärer Schultererkrankungen spielt, insbesondere für proliferative und fibrosierende Prozesse in der Bursa und im periartikulären Gewebe.

Aus den Ergebnissen sollten spezifische operative Empfehlungen bezüglich einer (partiellen) Bursektomie im Rahmen dekomprimierender und rekonstruktiver Eingriffe an RM bzw. subacromialem Raum abgeleitet werden.

Bei der untersuchten Patientenkohorte handelte es sich bezüglich der Geschlechts- und Altersverteilung, des Anteils der zugrunde liegenden periartikulären Krankheitsbilder und deren Ursachen, der betroffenen rupturierten RM-Muskeln sowie der beobachteten Begleit-Bursitis um eine mit der Literatur vergleichbare Kohorte.

Die Bursa subacromialis wurde für die histologischen, molekularbiologischen und biochemischen Untersuchungen in einen acromionnahen, zentralen und acromionfernen Abschnitt geteilt. Die einzelnen Abschnitte der Bursa subacromialis zeigten bei Patienten mit periartikulären Schultererkrankungen histologisch starke Unterschiede. Im acromionnahen Abschnitt waren eine Kapselverdickung und Bindegewebsvermehrung erkennbar. Im zentralen Abschnitt wurden dagegen vermehrt Gefäß- und Drüsenstrukturen bzw. Fettvakuolen beobachtet. Der acromionferne Abschnitt war erneut durch eine Bindegewebsvermehrung und außerdem das Auftreten sehnenähnlicher Zellen gekennzeichnet.

In der Betrachtung der gesamten Bursa subacromialis ergab sich im Vergleich zu gesunden Synovialmembranen auf mRNA-Ebene eine signifikante Erhöhung des Matrixproteins Kollagen II und eine numerische Gesamterhöhung der Matrixproteine Kollagen I, III, X und Aggrecan sowie der Wachstumsfaktoren TGF- β , bFGF, BMP-2 und BMP-7. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Regionen der Bursa subacromialis zeigten sich für Kollagen I, X und Aggrecan sowie für die Wachstumsfaktoren TGF- β , bFGF und BMP-7. Die höchsten Werte waren jeweils acromionnah zu verzeichnen. Die Expression der Entzündungsfaktoren wies nur geringe regionale Unterschiede auf.

Auf der Protein-Ebene ergab die semiquantitative Analyse eine regional gleichmäßige Präsenz der Matrixproteine Kollagen I und II. Kollagen X wurde lediglich acromionnah und acromionfern detektiert. Die Aktivität von Alkalischer Phosphatase bzw. die Expression der BMPs war in der acromionnahen und zentralen Region der Bursa subacromialis betont.

Die Ergebnisse zeigen, dass es in der Bursa subacromialis zu einer verstärkten Ablagerung der Kollagene vom Bindegewebstyp (Kollagen I und III) im Sinne einer Fibrose kommt. Die Expression/Synthese von knorpel- und knochenspezifischen Matrixmolekülen (Kollagen II, X und Aggrecan), BMP-2 und -7 sowie die Aktivität von Alkalischer Phosphatase stellen außerdem deutliche Hinweise auf eine chondroide Metaplasie mit starker Betonung im acromionnahen und zentralen Bereich der Bursa dar.

Durch die starken regionalen Veränderungen der Bursa subacromialis im acromionnahen (und zentralen) Abschnitt und die räumliche Nähe dieser Regionen zu der Sehne des M. supraspinatus könnte die Bursa einen Einfluss auf die Pathogenese der periartikulären Schultererkrankungen und das hohe Re-Rupturrisiko bei RM-Ruptur haben. Aufgrund von ausgeprägter chondroider Metaplasie und degenerativen Veränderungen insbesondere im acromionnahen Abschnitt erscheint eine (partielle) Bursektomie bei rekonstruktiven/dekomprimierenden operativen Eingriffen an RM bzw. subacromialem Raum gerechtfertigt.

2. Einleitung

Schulterbeschwerden gehören in den Industrienationen zu den häufigsten Beschwerden im gesamten Bewegungsapparat (6,6 – 25% aller muskuloskelettaler Beschwerden) (Shin MK, 2011). Als Ursachen des Schulterschmerzes kommen neben intraartikulären Störungen (z.B. bei der Omarthrose) v.a. Störungen der periartikulären Strukturen in Frage. Hierzu zählen Defekte der Rotatorenmanschette (RM), das Impingementsyndrom, die Tendinitis calcarea, die Frozen Shoulder und Schulterinstabilitäten. Diese Erkrankungen können mit oder ohne entzündliche Veränderungen der Bursa subacromialis (Bursitis subacromialis) auftreten (Rowe CR, 1988; Birnbaum K & Lierse W, 1993). Inwieweit diese Veränderungen eine Bedeutung für die Entstehung von RM-Rupturen oder deren Heilung haben, ist derzeit noch nicht vollständig geklärt.

Für die Entstehung der Bursitis subacromialis sowie Veränderungen der periartikulären Strukturen gibt es zahlreiche intrinsische und extrinsische Erklärungsmodelle, jedoch ist die genaue Ätiologie der damit eventuell verbundenen Sehnendegeneration bisher unbekannt.

2.1. Aufbau und Funktion der Bursa subacromialis

Die Bursa subacromialis ist der größte Schleimbeutel im menschlichen Körper und stellt bezüglich ihrer Funktion bzw. ihrer Verbindung zu Nachbarstrukturen eine hochkomplexe anatomische Struktur dar (Birnbaum K & Lierse W, 1992).

Die Bursa subacromialis ist neben dem glenohumeralen Gelenk die zweite synoviale Höhle des Schultergelenkes und fungiert als Gleitschutz bei der Abduktionsbewegung der Supraspinatussehne (Codman, EA 1934; Beals, TC et al., 1998).

Auch aus klinischer Sicht ist die Bursa als eine essentielle Struktur des Schultergelenkes anzusehen. Es wird z.B. ein Zusammenhang zwischen der Bursitis und den mikro- und makroskopischen Veränderungen in den Sehnen der RM angenommen (Rahme, H et al., 1993).

Die Bursa subacromialis liegt im subacromialen Raum zwischen dem Acromion und dem Humeruskopf. Nach lateral dehnt sich die Bursa subacromialis bis zum Sehnenansatz des M. supraspinatus aus, medial bis zum Acromioclaviculargelenk (AC-Gelenk). Das Lig. coracoacromiale ist die frontale und der M. infraspinatus (IFS) die dorsale Begrenzung (Abb. 1) (Birnbaum K und Lierse W, 1992).

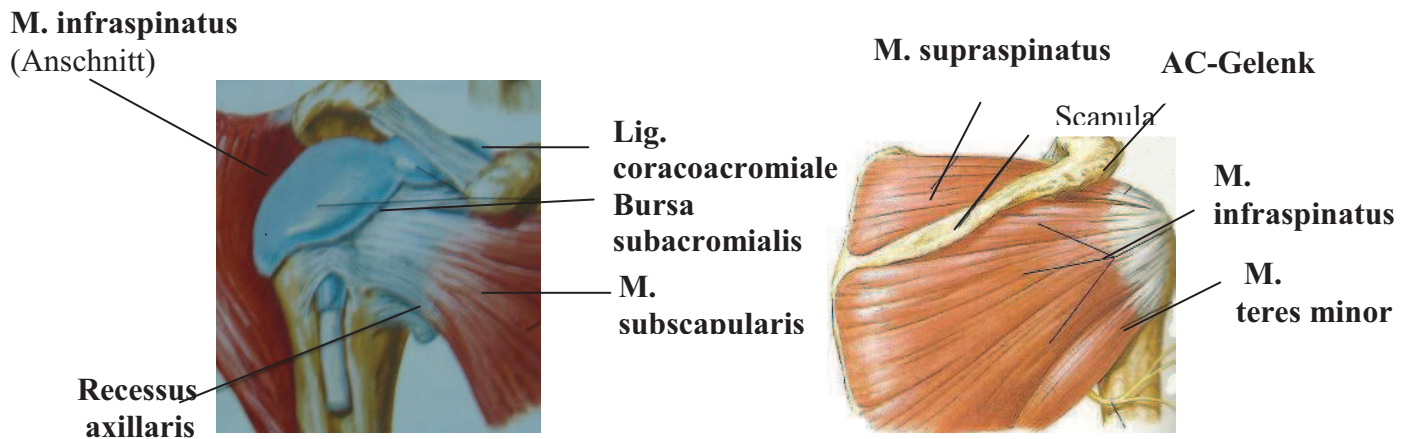


Abb. 1: Bursa subacromialis von ventral und dorsal (aus: Netter; Atlas der Anatomie des Menschen, 2000)

Dargestellt sind die Bursa subacromialis unter dem Acromion sowie die Muskeln der RM

Unter physiologischen Bedingungen ist die Bursa ein dünner Hohlraum im subacromialen Bereich, der eine Drüsenfunktion besitzt und mit 6-8 ml klarer seröser Flüssigkeit gefüllt ist.

Wie jede synoviale Struktur weist die Kapsel der Bursa ein viszerales und parietales Blatt auf. Die Verschiebbarkeit zwischen dem viszeralen und parietalen Blatt der Bursa ermöglicht die Beweglichkeit der Sehne des SSP im Subacromialraum (Birnbaum K und Lierse W, 1992). Hier können durch degenerative oder traumatische Prozesse entstandene Kalkablagerungen durch eine pathologisch entstandene Verbindung bei einer RM-Ruptur oder bei degenerativen Prozessen in die Bursa einbrechen (Birnbaum K und Lierse W, 1992).

Bei der Abduktion liegt die Bursa gestreckt auf der Sehne des SSP und nur der distale Ansatz der Sehne gleitet über den Rand des Acromions. Erst bei weiterer Elevation des Arms (mehr als 60°) bewegt sich die Bursa, weiterhin auf der Sehne des SSP liegend, in Richtung Fossa supraspinata (Birnbaum K & Lierse, W 1992).

Die Bursa subacromialis ist durch ihre subacromiale Lage (Abb. 2) einer mechanischen Kompression ausgesetzt, die z.B. bei Abduktionsbewegungen des Arms oder bei zunehmenden pathologischen Einengungen des subacromialen Raumes verstärkt wird.

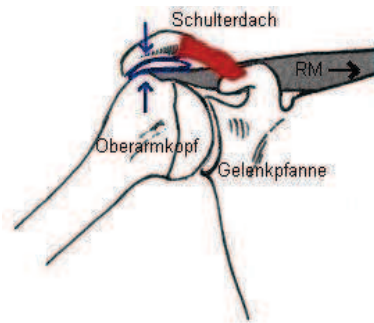


Abb. 2: Kompression der Bursa subacromialis bei Abduktion (aus: <http://www.krankenhaus-bobingen.de/chirurgie/schwerpunkte/unfall/schulter/anatomie01.htm>)

Die Pfeile zeigen die Einengung des Subacromialraumes bei Abduktion des Oberarmes

Als Ursachen für eine zunehmende Enge im subacromialen Raum kommen arthrotische (z.B. Acromionsporn, Arthrose im AC-Gelenk) oder traumatische Veränderungen (z.B. fehlende Zentrierung des Humeruskopfes bei Verletzungen der Rotatorenmanschette) in Frage.

Allerdings erklärt die daraus resultierende mechanische Belastung der Bursa subacromialis nicht alle Bursitiden. Es ist also davon auszugehen, dass es unabhängig von der Gelenkmechanik weitere Zusammenhänge zwischen Veränderungen der Bursa subacromialis und der RM geben muss (wie z.B. entzündliche und degenerative Veränderungen).

Die Bursa kann im Längsschnitt in 3 Abschnitte unterteilt werden (Abb. 3).

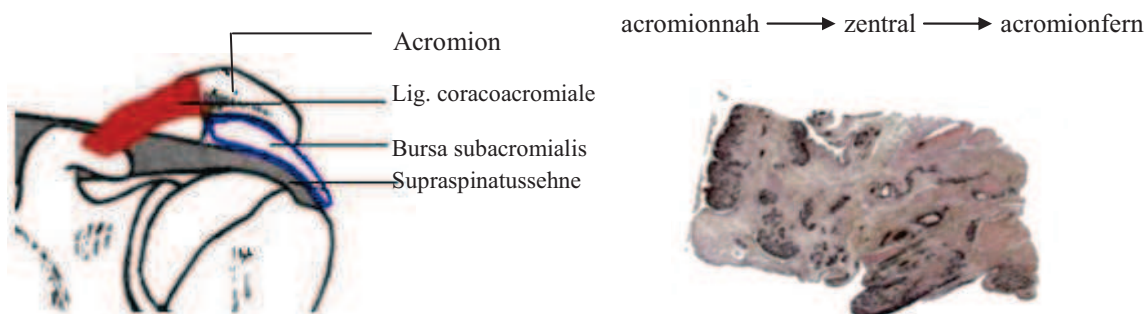


Abb. 3: Bursa subacromialis im Längsschnitt (aus: <http://www.krankenhaus-bobingen.de/chirurgie/schwerpunkte/unfall/schulter/anatomie01.htm>)

Es ist Bursa subacromialis unter dem Acromion dargestellt und ein Längsschnitt (HE-Färbung) mit der Unterteilung in die 3 Abschnitte

- den acromionnahen Abschnitt (Kortex aus kompaktem Gewebe mit einzelnen sekretorischen Azini)
- den zentralen Abschnitt (retikuläres Bindegewebe und Gefäße – v. a. Arteriolen, Venolen – sowie sekretorische Gangstrukturen)
- den acromionfernen oder gelenk- bzw. sehnennahen Abschnitt (kompaktes Bindegewebe).

Für die Beantwortung der Fragestellungen in der vorliegenden Arbeit wurden die 3 einzelnen Abschnitte der Bursa subacromialis daher separat histologisch, molekularbiologisch und biochemisch beurteilt.

2.2. Aufbau und Funktion der Rotatorenmanschette

Die Rotatorenmanschette besteht aus den folgenden 4 Muskeln:

- M. supraspinatus (SSP)
- M. infraspinatus (IFS)
- M. teres minor (TM) und
- M. subscapularis (SSC).

Sie verlaufen von der Scapula zum Tuberculum majus bzw. minus des Humerus und umgreifen haubenförmig den Humeruskopf (Abb. 4 und 5). Die RM liegt zwischen den 2 synovialen Höhlen des Schultergelenkes; der Bursa subacromialis und dem glenohumeralen Gelenk (vgl. mit Abb. 1 und 3).

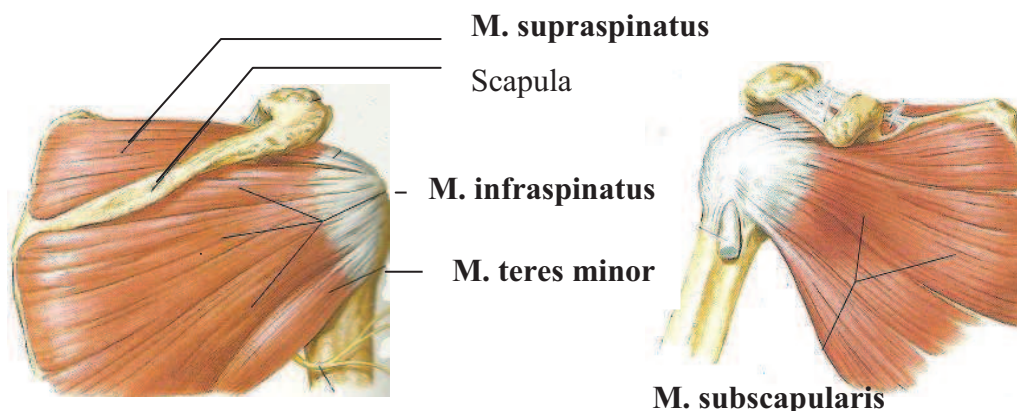


Abb. 4: Rotatorenmanschette von dorsal und ventral (aus: Netter; Atlas der Anatomie des Menschen, 2000)

Dargestellt sind die 4 Muskeln der RM; M. supraspinatus, M. infraspinatus, M. subscapularis und M. teres minor

Der komplette Bewegungsumfang des Schultergelenkes wird erst mittels der Weichteilführung durch die Muskeln der RM und deren kapselverstärkender Wirkung ermöglicht, denn der große Humeruskopf artikuliert mit einer viel kleineren Gelenkpfanne (Abb. 5). Für die Innenrotation des Oberarmes ist hauptsächlich der M. subscapularis (SSC) verantwortlich. Der M. infraspinatus (IFS) dient der Außenrotation. Dabei wird er durch den M. teres minor (TM) unterstützt, der zusätzlich den Arm adduziert. Die Abduktionsbewegung

erfolgt durch die Mitwirkung des M. supraspinatus (SSP). Er rotiert den adduzierten Arm nach außen und hebt ihn nach vorne außen.

Das Schultergelenk ist ein Komplex aus 3 einzelnen Gelenken (s. Abb. 5), dem Glenohumeralgelenk (a), Sternoclavikulargelenk und Acromioclavikulargelenk (b) sowie dem skapulothorakalen und subacromialen Gleitlager.

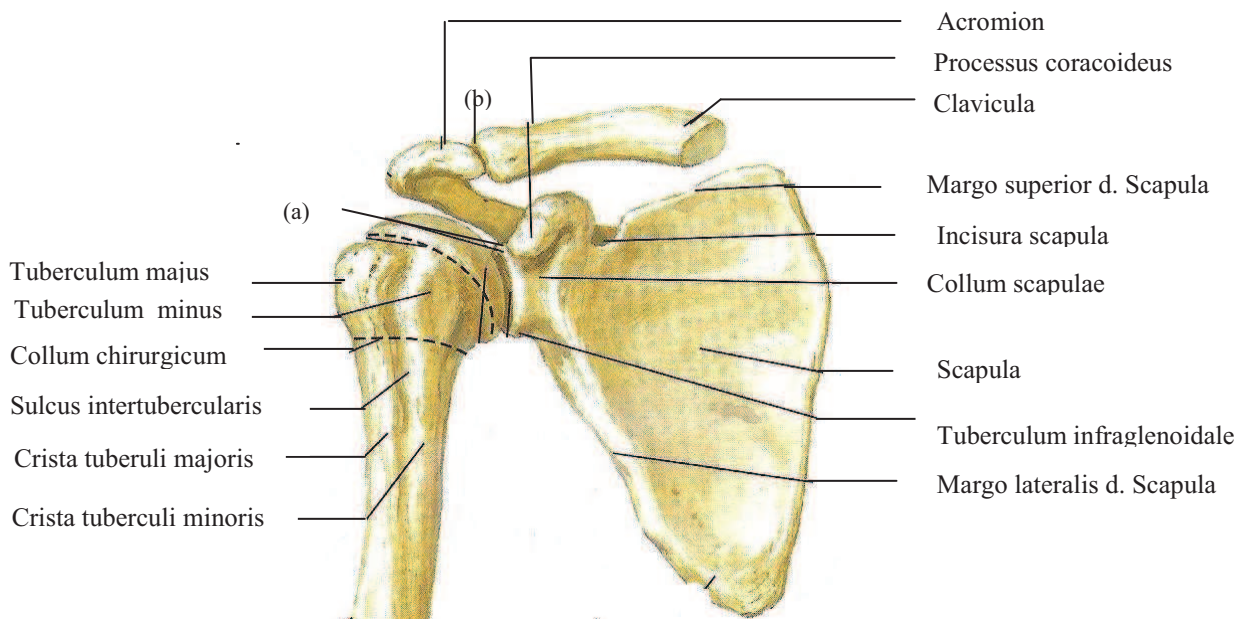


Abb. 5: knöcherne Anatomie des Schultergelenkes (aus: Netter; Atlas der Anatomie des Menschen, 2000); (a) Glenohumeralgelenk; (b) Acromioclavikulargelenk

2.3. Periartikuläre Krankheitsbilder

Zur Erklärung der Pathogenese der periartikulären Krankheitsbilder existieren einerseits verschiedene extrinsische (subacromiale Enge, ungünstige Acromionform) und andererseits intrinsische Theorieansätze (altersbedingte Sehnenveränderungen, mukoide Degeneration, Expression und Wirkung lokaler Wachstumsfaktoren in der Bursa subacromialis) (Ozaki, J et al., 1988; Tillander B et al., 2001; Hamada K et al., 1997; Uthoff HK. et al., 2000; Kobayashi K et al., Yanagisawa K et al., 2001).

Degenerative Veränderungen in der RM korrelieren eng mit dem Alter und betreffen so etwa 70% der über 60-jährigen und 80% der über 70-jährigen Patienten (Murrell GAC & Walton JR, 2001). Das liegt wahrscheinlich daran, dass es im höheren Alter zur Degeneration von Kollagenfasern bzw. reduzierten Blutzufuhr in der „kritischen Zone“ der Supraspinatussehne kommt. Dies betrifft v.a. die Gelenkseite der RM (Uthoff HK et al., 1986).

Weiterhin ist es denkbar, dass die Bursa subacromialis aktiv eine Erkrankung der RM induzieren kann, beispielsweise durch die o.g. Expression pro-inflammatorischer Zytokine oder Prokollagene.

Im Folgenden wird speziell auf die Krankheitsbilder eingegangen, die die periartikulären Gewebe des Schultergelenkes betreffen.

2.3.1. Das Impingementsyndrom

Der Begriff des Impingementsyndroms wurde von Neer 1972 geprägt und beschreibt eine Einengung des schon unter physiologischen Umständen engen Bereichs, der sich zwischen Acromion, Lig. coracoacromiale, Acromioclaviculargelenk, Tuberculum majus und Humeruskopf befindet. Ursache des Impingementsyndroms ist ein mechanisches Hindernis im subacromialen Raum mit Irritationen insbesondere der Sehne des SSP und der Bursa subacromialis (Mayerhöfer ME, 2004; s. Abb. 2, 4 und 5).

Es wurden von Bigliani (1991) 3 Formen des Acromions beschrieben – das flache (Typ I), das gekrümmte (Typ II) und das hakenförmige Acromion (Typ III), wobei beim Acromion-Typ III eine Häufung degenerativer Veränderungen und RM-Rupturen beschrieben wurde (Löhr JF, 2007). Unabhängig von der anlagebedingten Acromionform können knöcherne Veränderungen wie Knochensporne am Vorderrand des Acromions oder Hypertrophien des Lig. coracoacromiale (Patte 1990) ebenfalls zu einer Einengung des subacromialen Bereiches führen. Ein mechanisch bedingtes Impingement führt laut Fukuda im tierexperimentellen Versuch zunächst zu Schädigungen der Fasern der RM auf der bursazugewandten Seite und erst sekundär zu Faserschäden auf der Gelenkseite der RM (Fukuda H et al., 1990).

Das Impingementsyndrom wird nach Neer in 3 Stadien unterteilt (Neer CS, 1983):

Das Stadium I ist reversibel mit ödematös geschwollenem und eingeblutetem Sehnengewebe.

Im Stadium II kommt es zu einer irreversiblen Fibrose und Verdickung der Sehnen.

Das Stadium III ist gekennzeichnet durch eine partielle oder komplette RM-Ruptur.

Klinisch typisch für ein Impingementsyndrom ist der so genannte „painful arc“. Dieser Begriff wurde 1977 von Kessel und Watson geprägt, wobei ein Bewegungsschmerz bei Abduktion des Arms zwischen 60° und 120° angegeben wird, wenn sich der Abstand zwischen Acromion und Tuberculum majus bei Abduktion verkleinert und dadurch die

Verschiebung der Bursawände erschwert wird. Im weiteren Verlauf klagen die Patienten über generalisierte Bewegungseinschränkungen und -schmerzen im Schulterbereich (z.B. bei Überkopfarbeiten, ständiger Armbeugung bei Fließbandarbeiten, etc.) und nächtliche Ruheschmerzen, v. a. wenn die Bursa subacromialis entzündlich verändert ist oder sich Kalkdepots in der Sehne ausbilden bzw. in die Bursa penetrieren.

Diagnostisch lässt sich ein Druckschmerz im Bereich des Tuberculum majus auslösen und man kann gelegentlich eine Krepitation und ein Schnappen bei Abduktion des Arms fühlen.

2.3.2. Rupturen der Rotatorenmanschette

Die Prävalenz der RM-Rupturen liegt zwischen 9 und 39% und korreliert mit dem Alter (<40 Jahre 0%, <50 Jahre 5%, 50-60 Jahre 11%, 60-70 Jahre 28%, >70 Jahre 50-54) (Milgrom C, 1995; Sher JS, 1995; Löhner JF, 2007). Männer sind dabei doppelt so häufig betroffen wie Frauen. Degenerativ bedingte Läsionen dominieren laut Neer (Neer CS, 1983) gegenüber traumatisch ausgelösten Läsionen (92-95% vs. 5-8%). Neuere Querschnittsstudien berichten hingegen, dass bei 40-72% der Patienten mit RM-Ruptur eine traumatische Ursache vorliegt (Yamaguchi K, 2006).

Bei einer Läsion der RM-Sehnen kommt es zum Humeruskopfhochstand, da der Humeruskopf nicht mehr in der Schulterpfanne zentriert wird. Dies führt zu einem Circulus vitiosus für die Sehnen und die Bursa. Zum einen forciert der Hochstand des Humeruskopfs eine weitere Einengung des subacromialen Raumes, zum anderen verstärken Adhäsionen der Bursa das Impingement zwischen dem Acromion und den Sehnenansätzen der RM (Machida A et al., 2004).

Die Prädispositionsstelle einer Ruptur der Sehne des SSP ist ihr Sehnenansatz am Tuberculum majus, die sogenannte „kritische Zone“. Diese Zone umfasst die Region in einer Entfernung von 5-20 mm vom Ansatz des SSP am Tuberculum majus und erfährt bei bestimmten Bewegungen eine Minderdurchblutung (Mayerhöfer ME, 2004). Die Sehnenansatzzone (d.h. die sog. „kritische Zone“) wird in 4 Regionen eingeteilt (Woo SL et al., 1987):

- Zone 1 (Sehne)
- Zone 2 (nicht - mineralisierter Sehnenansatz)
- Zone 3 (mineralisierter Faserknorpel)
- Zone 4 (Knochen)

Von der Sehnenansatzzone 1, in der schmale und längliche Tendozyten zwischen parallel ausgerichteten Kollagenfasern liegen, bis zur Zone 4 werden die Sehnenzellen runder und

liegen verstreuter im Bindegewebe (Clark J & Stechschulte jr., DJ 1998; Oguma H et al., 2001).

Die reißfeste und starke Verbindung zwischen der Ansatzsehne (Zone 2; Grundsubstanz v. a. Kollagen II) und dem Knochen (Zone 4) kommt dadurch zustande, dass die Sehnenfasern bis in die Knochenlamellen hineinreichen und im mineralisierten Faserknorpelansatz (Zone 3) in einer Art senkrecht zueinander verlaufendem Raster vorliegen (Junqueira LC & Carneiro J, 1996 b).

Im Faserknorpel (Zone 3) liegen die Knorpelzellen ausdifferenziert und eingebettet in der Knorpelmatrix zwischen den Sehnenzellen vor. Der Faserknorpel besitzt sowohl Eigenschaften des Sehngewebes als auch des hyalinen Knorpels und ist druck- und scherkraftstabil. Allerdings ist die Steifheit des Gewebes innerhalb der Sehne des SSP inhomogen. Die Gewebesteifheit ist an der der Bursa-zugewandten Seite der SSP-Sehne höher als an der Gelenk-zugewandten Seite (Lee SB et al., 1999). Dies wird als funktionelle Adaptation an mechanische Kräfte interpretiert, die auf die Sehne des SSP einwirken. In Regionen mit Kompressionsbelastung finden sich deshalb vermehrt fibrocartilaginäre Gebiete (Benjamin M et al., 1998; Riley E et al., 1999).

Der SSP und IFS haben eine gemeinsame ventrale Insertionsselle ihrer Ansatzsehnen am Tuberculum major des Oberarmkopfes und dienen der Außenrotation und Abduktionsbewegung, den beiden kraft- und bewegungsaufwändigsten Bewegungen im Schultergelenk. Die Muskeln sind aufgrund der starken Kraftwirkung bei der Rotation im Oberarmkopf hohen Zugkräften, aber auch erheblichen Scherkräften ausgesetzt. Diese können die Kollagenfasern schwächen und zu sekundären Einrissen an den Sehnen der RM führen (Boehm TD, 2007; Löhr JF, 2007).

Rupturen der RM werden einerseits in Abhängigkeit von der Defekttiefe der betroffenen Sehne in partielle und komplette Rupturen unterteilt, andererseits entsprechend der Seite des Defektes – in gelenkseitige Rupturen auf der Seite des Glenohumeralgelenks (Typ A nach Neer und Synder) oder in bursa-/acromionseitige Rupturen (Typ B nach Neer und Synder; Abb.6).

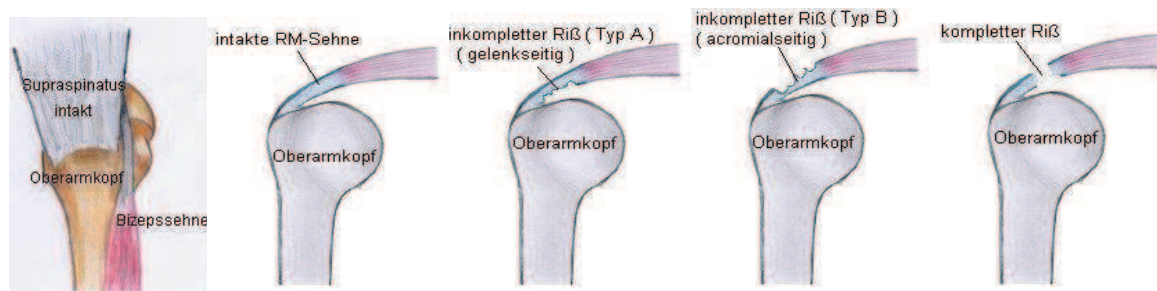


Abb. 6: RM-Rupturformen nach Neer und Synder (aus: <http://www.krankenhaus-bobingen.de/chirurgie/schwerpunkte/unfall/schulter/RM.htm#was>)
Darstellung einer inkompletten und kompletten Ruptur der RM am Beispiel des SSP

Der gelenkseitige Anteil der RM ist häufiger und frühzeitiger von degenerativen Veränderungen betroffen als der bursa-/acromionseitige Anteil. Der Grund dafür könnte sein, dass es hier weniger Blutgefäße gibt und zudem die Kollagenfasern und -bündel dünner und weniger einheitlich sind (Ozaki J et al., 1988; Fukuda H et al., 1996).

Die Patienten mit einer RM-Ruptur klagen über Bewegungs- und Nachtschmerzen. Bewegungen wie Überkopfarbeiten, Außendrehung und Rückführung des Arms sind schmerzhaft eingeschränkt. Bei der klinischen Untersuchung ist das Tuberculum majus druckschmerzhaft. Die Widerstandstests (z.B. Jobe-Test, drop-arm-Sign) der entsprechenden Muskeln sind positiv. Bei der klinischen Untersuchung fällt zumeist eine im Vergleich zur Gegenseite schwächere Schultermuskulatur auf. Durch die Schmerzen schonen die Patienten die Schulter und es resultiert im Verlauf eine Atrophie v. a. der Supra- und Infraspinatussehne. Typisch ist der schmerzhafte Bogen mit der typischen Schmerzangabe beim Abduzieren des Armes zwischen 60° bis 120°.

Der Riss in einer Sehne der RM vergrößert sich durch eine zufällige Bewegung oder durch Muskelkräfte und kann die gesamte RM durchziehen und nimmt schließlich eine Halbkreis- oder Dreiecksform an (Abb. 7). Der Oberarmkopf ist nicht mehr muskulär gedeckt und tritt höher. Der subacromiale Raumengt sich weiter ein und es entsteht ein Circulus vitiosus.

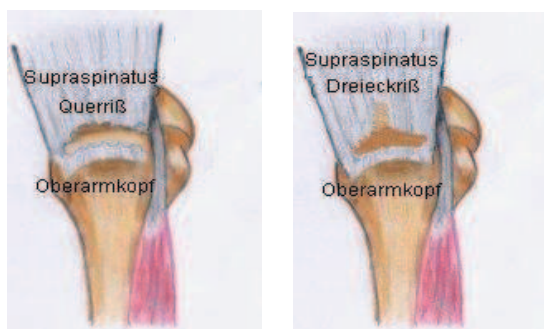


Abb. 7: Formen der kompletten RM-Ruptur (aus: <http://www.krankenhaus-bobingen.de/chirurgie/schwerpunkte/unfall/schulter/RM.htm#was>)
Die Ruptur nimmt eine Halbkreis- oder Dreiecksform an

Die Diagnose einer RM-Ruptur wird durch die klinische Untersuchung sowie durch bildgebende Verfahren wie Ultraschall und MRT gestellt. Eine sonografisch ($> 2 \text{ mm}$) vergrößerte Bursa und eine intraartikuläre Flüssigkeitsaufnahme sind hochspezifisch für das Vorliegen einer RM-Ruptur (Hollister MS et al., 1995; Tsai YH et al., 2006). Zusätzliche Röntgenaufnahmen dienen differentialdiagnostisch der Darstellung von gelenknahen Veränderungen oder der Abschätzung der subacromialen Distanz zwischen Acromion und Humeruskopf sowie dem Ausschluss von Frakturen.

Bei Rupturen der RM stehen unterschiedliche Behandlungsmaßnahmen zur Verfügung. Dabei unterscheidet man rekonstruktive Behandlungen (z.B. Naht der RM-Ruptur) von symptomatischen Behandlungen, die eine Schmerzlinderung (z.B. durch nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAR), lokale Infiltrationen von Lokalanästhetika, lokale Applikation von Kälte) sowie die Aufrechterhaltung der Schulterbeweglichkeit (z.B. durch Physiotherapie, Manualtherapie, motorisierte Bewegungsschienen) zum Ziel haben. Befinden sich Kalkdepots in den Sehnenansätzen, wie bei der Tendinitis calcarea, kann versucht werden, deren Resorption durch sog. Needling oder extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT) zu beschleunigen. Durch den sinnvollen Einsatz von konservativen Behandlungsmaßnahmen erreicht man bei der Hälfte der Patienten ein zufriedenstellendes Ergebnis, obwohl die Ruptur selbst unbehandelt bleibt (Sakai H et al., 2001).

Ein operativer Eingriff wird in 12-61% aller RM-Rupturen notwendig (Itoi E, 1992). Die rekonstruktiven Behandlungen beinhalten eine Wiederherstellung der teilweise oder vollständig gerissenen Sehnenstrukturen. Welches operative (offene oder arthroskopisch/endoskopische) Verfahren durchgeführt wird, ist von der Rissgröße, der Retraktion des Sehnenstumpfes und dem Zustand der restlichen Schultermuskulatur abhängig. Der Eingriff umfasst weiterhin eine knöcherne Erweiterung des subacromialen Raums mit Resektion des Lig. coracoacromiale, die Entfernung knöcherner Ausziehungen am Acromion und ggf. der Bursa subacromialis und der Kalkdepots.

Prognostische Faktoren der rekonstruktiven Maßnahmen sind neben der Rupturgröße die Zeitspanne zwischen Ruptur und Operation, die Qualität von Sehnen und Muskeln, die Retraktion des Muskels sowie das biologische Heilungspotenzial (Patientenalter) und die Operationstechnik (Safran O et al., 2005). Die Muskeln der RM zeigen nach Ruptur eine hohe Rate von Atrophien mit Fettansammlungen, die für die teilweise enttäuschenden postoperativen Resultate verantwortlich sein kann (Meyer CD, 2005; Chen CH, 2010; Shindle MK, 2011).

Aktuell besteht kein klinischer Konsens, welches Vorgehen bezüglich der Bursa subacromialis bei der operativen Versorgung von RM-Verletzungen präferiert wird.

Uthoff lehnt z.B. die Resektion der Bursa ab. Er beobachtete 2 Wochen nach ossärer Reinsertion der SSP eine höhere Zelldichte in der Bursa subacromialis als im Sehnenansatz. Er folgert daraus, dass die Bursa möglicherweise durch die Expression bzw. Synthese von proliferationsfördernden Substanzen einen positiven Einfluß auf die Sehnenheilung besitzt (Uthoff HK, et al., 1991 und 2000).

Andere Autoren befürworten hingegen eine Bursektomie, weil in der Bursa subacromialis bis zu 10 Monate nach RM-Ruptur Zellen mit langfristig erhöhten mRNA-Werten für Kollagen III nachgewiesen werden konnten. Die Fasern von Kollagen III sind bekannterweise dünner ausgebildet als beispielsweise die Fasern von Kollagen I und führen damit zu einer Schwächung der Sehnenkraft (Eriksen H et al., 2002). Zudem geben einige Studien Hinweise darauf, dass die Bursa subacromialis verschiedene pro-inflammatorische Zytokine (IL-1 β , IL-6 und TNF- α) exprimiert und somit die chronische Entzündung und den Gewebeabbau unterhält. Diese Zytokine können außerdem zu einer Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten führen. Diese vermehrte Differenzierung von Myofibroblasten und die anschließende Fibrosierung des Gewebes kann zusätzlich die Schulter in ihrer Beweglichkeit einschränken (Tomonaga A & Gotoh M et al., 2000; Ko JY et al., 2007). Zusätzlich ist die Bursa für die Schmerzempfindung im Schulterbereich verantwortlich. Im Gewebe der Bursa wurden vermehrt freie Nervenenden, Mechanorezeptoren und die Substanz P nachgewiesen. Eine Bursektomie würde also einer therapeutischen Denervierung entsprechen (Gotoh M et al., 1998; Vaz S, 2000).

Im Vorfeld muss der Patient über mögliche Risiken und Komplikationen der operativen Therapien aufgeklärt werden. Selbst nach Ausheilung einer operativ versorgten RM-Ruptur können Kraft und Bewegungsumfang des Schultergelenks im Vergleich zur Gegenseite gemindert bleiben (Rokito A et al., 1999). Auch Re-Rupturen sind häufig (bis zu 40%). Die Ausdehnung der fibrocartilaginären Sehnenansatzzone mit Verringerung der Zugfestigkeit soll für das erhöhte Rerupturrisiko verantwortlich sein (Rickert M et al., 1998; Knudsen HB, 1999; Gerber C et al., 2000; Murrell GAC & Walton JR, 2001; Fuhrmann R et al., 2002). Unklar ist bisher jedoch, welche Faktoren für diese Gewebemetaplasie verantwortlich sind und welchen Einfluss die Bursa subacromialis auf die Entstehung der RM-Ruptur sowie deren Heilung hat.

2.3.3. Tendinitis calcarea

Die Tendinitis calcarea wird auch Periarthritis humeroscapularis genannt und ist ein eigenständiges Krankheitsbild. Die als selbstlimitierend geltende Erkrankung tritt zwischen dem 3. und 5. Lebensjahrzehnt auf und betrifft Frauen etwas häufiger als Männer (Verhältnis 6:4). Bei ungefähr 8,8-40% der Patienten ist ein bilateraler Befall zu beobachten (Rupp S, 2003), der in der Regel mit röntgenologisch erkennbaren Verkalkungen in der Supraspinatussehne einhergeht.

Die Ursache für die Entstehung der Kalkablagerung ist noch nicht eindeutig geklärt. Es werden zwei Theorien diskutiert:

Durch mechanische Reize (Schultertraumen bzw. die subacromiale Enge) und/oder eine länger anhaltende Minderdurchblutung kommt es zu degenerativen Veränderungen. Im Sehngewebe liegt dann ein sauerstoffarmer Zustand vor, der zu Nekrosen und sekundären Verkalkungen führen kann.

Eine andere Theorie ist die von Uthoff et al. 1975 beschriebene aktive Kalzifizierung mit phasenhaftem Verlauf (Rupp S, 2001). Während der Erkrankung kommt es zu einer fibrocartilaginären Transformation von Tendozyten zu Chondrozyten. In der Interzellularsubstanz entstehen Hydroxylapatitkristalle, gebildet von Chondrozyten, die in so genannten Matrixvesikeln gelagert werden. Klinisch sind die Patienten in diesem frühen Stadium asymptomatisch. Auch röntgenologisch sind noch keine Kalkherde sichtbar. In der Kalzifikationsphase verschmelzen die Vesikel miteinander. Die Patienten leiden unter akuten Schmerzen und die Kalkdepots gehen von einem flüssigen über einen pastösen in einen soliden Zustand über. Die meisten Kalkherde liegen in der Ansatzzone der Supraspinatussehne. Durch die Volumenzunahme mit intratendinöser Druckerhöhung sind Spontanperforationen der Kalkdepots in die Bursa subacromialis oder in das Schultergelenk möglich. Es resultiert eine akute und hoch schmerzhaft Bursitis subacromialis. Nach Wochen bis Monaten wandern als Zeichen einer begleitenden Entzündungsreaktion Phagozyten und andere Zellen ein, die das Kalkmaterial resorbieren. Die Resorptionsraten liegen über Beobachtszeiträume von 6 Monaten bis 5 Jahren zwischen 30 und 50%. Die reaktive Hyperämie kann zu einer vermehrten Oxidation mit Freisetzung von CO_2 führen. So besteht die Möglichkeit, dass der Kalk durch einen Umschlag der bisher alkalischen Reaktion in ein saures Milieu aufgelöst wird. Es schließt sich das Reparationsstadium mit vermehrter Gefäßinvasion und Bildung von Granulationsgewebe durch einwandernde Fibroblasten an. Kommt es im Rahmen der Erkrankung zu einer vollständigen Ossifikation des Kalkdepots, ist diese Resorption nicht mehr möglich.

Die Tendinitis calcarea kann lange Zeit asymptomatisch bleiben. Im fortgeschritten Stadium klagen die Patienten über lage- und bewegungsabhängige Schmerzen in der betroffenen Schulter. Diagnostisch können die Impingement- und Widerstandstests positiv sein. Beweisend sind Röntgenaufnahmen, in denen die Kalkdepots deutlich sichtbar sind (Abb. 8).



Abb. 8: Kalkdepot bei einer Tendinitis calcarea

Konventionelle Röntgenaufnahme ap mit Darstellung von Kalkepots

Die Schulter wird zur Entlastung innenrotiert und adduziert gehalten, die Beweglichkeit ist schmerzhaft eingeschränkt.

Aufgrund der möglichen Spontanheilung wird therapeutisch ein konservatives Vorgehen angestrebt. Im akuten Stadium sind subacromiale Infiltrationen z.B. mit Bupivacain und Prednisolon sowie die Lagerung des betroffenen Arms in einem Abduktionskissen hilfreich. Zur Schmerzlinderung ist weiterhin die Gabe von NSAR indiziert. Um die Schulter beweglich zu halten und einer Muskelatrophie vorzubeugen, sollen zusätzlich zu den eben beschriebenen Maßnahmen im beschwerdefreien Intervall krankengymnastische Übungen durchgeführt werden. Durch eine Stoßwellentherapie mit gepulsten Ultraschall (ESWT) oder Röntgenbestrahlung kann versucht werden, eine vorzeitige Resorption der Kalkherde zu erreichen. Alternativ kann das sogenannte Needling versucht werden, um das Kalkmaterial aus der Sehne zu spülen bzw. zu aspirieren. Der Eingriff erfolgt in Lokalanästhesie unter sonografischer oder röntgenologischer Kontrolle.

Helfen diese therapeutischen Schritte nicht oder hat sich aus dem Kalkdepot eine solide Raumforderung ausgebildet, kann eine operative, nach Möglichkeit arthroskopische, Ausräumung der Kalkdepots aus der RM notwendig werden.

2.3.4. Bursitis subacromialis

Als extrinsische Ursachen für die Entstehung der Bursitis gelten die anatomischen Gegebenheiten an der Schulter: Formvarianten des Acromions nach Bigliani (Seitz AL et al., 2011; Ozaki J et al., 1988), Schäden an der RM, ein hoch stehender Humeruskopf durch eine RM-Läsion, osteophytäre Anbauten am Acromion und eine Hypertrophie des Lig. coracoacromiale. Intrinsische Ursachen können z.B. eine Volumenzunahme der RM sein, bedingt durch intratendinöse Kalkeinlagerungen oder bursaseitige RM-Rupturen.

Der Schmerz wird bei der symptomatischen Bursitis subacromialis am Tuberculum majus angegeben und die Abduktion des Armes ist zwischen 60° bis 120° schmerzhaft. Im Ultraschall oder MRT ist eine deutlich vergrößerte Bursa zu sehen. Röntgenaufnahmen sind unauffällig.

Therapeutisch müssen zuerst die Schmerzen gelindert werden, damit aktive Behandlungen möglich werden. Hierzu können NSAR, Kälteanwendungen und Infiltrationen mit Lokalanästhetika dienen. Bleibt dieses konservative Vorgehen frustan, ist eine Bursektomie, ggf. in Kombination mit einer subacromialen Dekompression indiziert. Durch die geringere Zugangsmorbidität hat sich die Endoskopie gegenüber dem offenen Zugang durchgesetzt.

2.3.5. Fibröse Schultersteife (Frozen shoulder)

Ausgeprägte Ruhe- und Bewegungsschmerzen, v. a. in der Außenrotation und Abduktion, sind typische klinische Zeichen dieser Erkrankung. Die Gelenkkapsel ist durch chronisch entzündliche Veränderungen fibrosiert (adhäsive Kapsulitis). Die Ätiologie der primären oder idiopathischen „Frozen shoulder“ ist unbekannt. Prädisponierende Faktoren sind Traumata, Hemiplegien, Pancoast-Tumore, Barbiturateinnahmen, koronare Herzerkrankungen sowie Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Störungen der Schilddrüsenfunktion und der Nebennieren (Milgrom C et al., 2008).

Von der selbstlimitierenden Erkrankung, die in 3 Stadien verläuft und zwischen 6 bis 24 Monate dauert, sind meist sind Frauen mittleren Alters betroffen. In der ersten oder „freezing“ Phase stehen nächtliche Schmerzen ohne wesentliche Bewegungseinschränkungen im Vordergrund. Das Stadium II wird „Frozen“ Phase genannt, da der Bewegungsumfang zunehmend limitiert ist. Die Schmerzen lassen jedoch nach. Die Bewegungseinschränkung löst sich dann im Stadium III, der „thawing“ Phase, auf. Therapieziele sind neben der Schmerzfreiheit die Wiederherstellung der Bewegung und eine Verbesserung der Schulterfunktion. Dazu stehen eine Reihe von therapeutischen Interventionen mit verschiedenen Erfolgsraten zur Verfügung. Das konservative Vorgehen beinhaltet die Anwendung von Analgetika, die Physiotherapie und intraartikuläre Injektionen (z.B. von Kortikosteroiden oder Lokalanästhetika). Operativ kann bei persistierender Bewegungseinschränkung eine arthroskopische Arthrolyse erfolgen.

2.4. Die Pathophysiologie der Rotatorenmanschettendegeneration: Chondrogene Metaplasie

Die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen in Binde- und Stützgewebe zu Knorpelzellen wird chondrogene Metaplasie genannt (Ji X, 2000) und ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt. Die chondrogene Metaplasie spielt bei degenerativen Veränderungen der RM eine wichtige Rolle.

Aus dem Mesoderm, dem mittleren Keimblatt, gehen die mesenchymalen Gewebe hervor. Mesenchymale Vorläuferzellen sind hauptsächlich im Knochenmark zu finden, weiterhin auch in Periost, Muskelgewebe, Blut und Leber. Sie sind pluripotent, d.h. aus ihnen entwickelt sich eine Vielzahl von Zellen des Binde- und Stützgewebes: Fibroblasten, Chondrozyten, Osteoblasten und Myoblasten (Nathanson MA, 1985; Nakahara H et al., 1991; Chen D et al., 1998; Campagnoli C et al., 2001; Fibbe WE, 2002; Balemans W, 2002). Zwischen diesen differenzierten Zellarten ist evt. eine Metaplasie, d.h. eine reversible Umwandlung in ein anders differenziertes Gewebe, möglich. Die ossäre Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen durch Stimulation mit BMPs ist durch in vitro und in vivo Studien belegt (Ji, X et al., 2000; Dorman LJ et al., 2012; Schmal H et al., 2012).

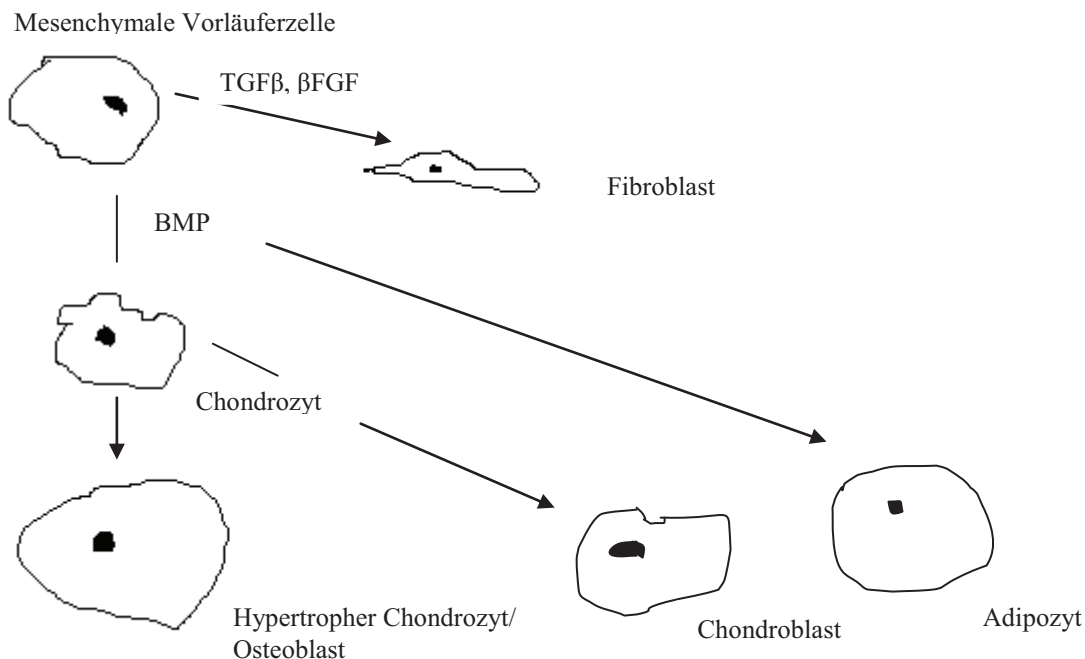


Abb. 9: Mesenchymale Differenzierung

Mesenchymale Differenzierung einer mesenchymalen Vorläuferzelle in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten unter dem Einfluß von BMPs

In vivo kann so die fibrokartilaginäre Umdifferenzierung, d.h. die wechselseitige Umwandlung von Fibroblasten in chondrozytäre Zellen, an den Sehnenansatzzonen der RM erklärt werden (Benya, PD et al. 1978).

Physiologisch ist eine solche Differenzierung beim Längenwachstum, wenn Knorpelzellen zu hypertrophen Knorpelzellen differenzieren. Bedeutsam ist sie auch für die Mineralisation und Kalzifikation der langen Röhrenknochen (Reddi A. et al., 1972; Weisser J et al., 2002). Beim Erwachsenen ist eine Metaplasie meist pathologisch und kann im Gewebe zu Mineralisationen führen (Aigner T. et al., 1998).

2.5. Die mikrostrukturelle und qualitative Zusammensetzung der RM

Die Komponenten, die für den Zusammenhalt einzelner Zellen im Gewebsverbund sorgen, werden als extrazelluläre Matrix (EZM) zusammengefasst. Die einzelnen Bestandteile und ihr Verhältnis zueinander bestimmen den Zusammenhalt, die Struktur sowie die mechanische Stabilität bzw. biochemischen Eigenschaften der EZM. Hauptsächlich wird die EZM von den Bindegewebszellen Fibroblasten, Tenozyten, Chondroblasten, Osteoblasten und Odontoblasten aber auch von Epithel- und Endothelzellen sowie glatten Muskelzellen aufgebaut. Die Zellen sezernieren verschiedene Proteine: Kollagene, Elastin, Proteoglykane und nichtkollagene Glykoproteine (Deutzmann R et al., 2003).

2.5.1. Die Kollagene

Als wichtige Bindegewebsbestandteile und größte Proteingruppe im menschlichen Körper sorgen die Kollagene für dessen Stabilität gegenüber mechanischer Belastung. Momentan sind 26 verschiedene Kollagentypen bekannt. Ihnen ist ein stabförmiger Grundaufbau gemein. Das Grundgerüst bilden drei Polypeptidketten, die α -Ketten. Diese Polypeptidketten winden sich umeinander und bilden so eine Tripelhelix (Hofmann H et al., 1978; Kühn K, 1986; v.d. Mark K, 1999). Die Ketten selbst sind durch wiederholtes Aneinanderreihen einer spezifischen Sequenz, Gly-X-Y, charakterisiert. X ist häufig ein Hydroxyprolin und Y ein Prolin. Die dritte Position Glycin ist immer im Zentrum der Helix, da hier nur die kleinste Aminosäure Platz findet.

Gebildet werden die Kollagenketten am rauen endoplasmatischen Retikulum (rER). Zuerst erfolgt die Synthese von $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Präprokollagen-Einfach-Helices. Die Prä-Sequenz wird abgespalten und das Prokollagen gelangt ins rER. Hier werden ca. 50% der Proline in der Y-Position hydroxyliert. Für die Hydroxylierung, auch die von Hydroxylysin, ist Ascorbinsäure als Co-Faktor erforderlich. Im nächsten Schritt werden die Hydroxylysylreste glykosiliert (O-glykosidische Bindung) und die Prokollagene werden in den extrazellulären Raum abgegeben.

Hier werden die amino- und carboxylterminalen Peptide abgespalten und die Kollagenmoleküle lagern sich zu Mikrofibrillen zusammen. Die Vernetzung geschieht durch die Desaminierung der Lysylreste (Fessler JH et al., 1985; Doege KJ et al., 1986).

Die unterschiedlichen Kollagentypen mit ihren verschiedenen biologischen Eigenschaften kommen durch die unterschiedlich langen tripelhelicalen Abschnitte, kurze Unterbrechungen in der Helix oder durch zusätzliche globuläre Domänen zustande. Hydroxyprolin bildet Wasserstoffbrücken, durch die der Schmelzpunkt der Kollagene erhöht wird, und sorgt so für die thermische Stabilität. Prolin stabilisiert den Bindungswinkel in der Kette. Dies sind die Voraussetzungen für die korrekte Faltung der Eiweiße (Junqueira LC & Carneiro J, 1996; Löffler G & Petrides P, 1997).

Es werden fibrilläre (Kollagen I, II, III, V und XI), Fibrillen-assoziierte (Kollagen IX, XII, XIV, XVI, XIX) und nicht-fibrilläre Kollagene unterschieden. Nicht-fibrilläre Kollagene werden unterteilt in Kollagene, die Transmembrandomänen (Kollagen XIII, XVIII), Netzwerke (Kollagen IV, VIII, X) oder Verankerungsfibrillen (Kollagen VII) bilden. Kollagen XV konnte bisher keinem Schema zugeordnet werden (v.d. Mark K, 1999).

Bei erhöhter oder dauernder mechanischer Beanspruchung können sich einzelne fibrilläre Kollagene (Kollagen I, II, III, V und XI) im Rahmen der Adaptation zu Mischfibrillen zusammenlagern, so dass sich ihr Gesamtdurchmesser vergrößert. Bei der so genannten funktionellen Anpassung spielen die Fibrillen-assoziierten Kollagene (Kollagen IX, XII, XIV, XVI, XIX) eine wichtige Rolle. Sie lagern sich anderen Kollagenen an, der Fibrillendurchmesser vergrößert sich und durch die Seitenketten ändern sich die chemischen Eigenschaften. Ein Beispiel ist die Anlagerung von Kollagen IX an Kollagen II, die zu einer erhöhten Hydrophilie führt. Dadurch wird Wasser in das Kollagen eingelagert und der Gelenkknorpel vor vermehrter mechanischer Abnutzung geschützt (Stevens A & Glowé J, 1997; Deutzmann R et al., 2003; Gelse K et al., 2003).

Für die Rotatorenmanschette sind folgende Kollagene relevant:

2.5.1.1. Kollagen I:

Es zählt zur Gruppe der fibrillären Kollagene und ist das am häufigsten vorkommende Kollagen. Kollagen I bildet 90% der Grundmasse von Knochen. Es ist ebenfalls Hauptbestandteil von Sehnen, Haut, Bändern und der Kornea. Kollagen I verleiht diesen Strukturen die nötige Steifheit und mechanische Zugfestigkeit. Aufgebaut ist es aus zwei $\alpha 1$

(I)-Ketten und einer $\alpha 2$ (I)-Kette (Kuivaniemi H et al., 1988). Eine wichtige Rolle spielt Kollagen I in der Embryogenese der Gewebe, bei der Zellproliferation und -migration, sowie der Hämostase und Wundheilung. Eine erhöhte Expression wurde nach Verletzungen beobachtet. Die Osteogenesis imperfecta ist eine Krankheit, die aus einem Defekt im Kollagen I-Gen resultiert. Charakterisiert ist die Erkrankung durch extrem zugschwache Sehnen, dünne Haut und Knochendefekte (Deutzmann R et al., 2003).

2.5.1.2. Kollagen II:

Kollagen II ist der Hauptbestandteil von hyalinem Knorpel und kommt außerdem in Sehnen, Bandscheiben und im Glaskörper des Auges vor (v.d. Mark, K, 1981; Junqueira LC & Carneiro J., 1996 b; Löffler G & Petrides P, 1997). Das Fibrillen-bildende Kollagen besteht aus drei $\alpha 1$ (II)-Ketten. Im Knorpel binden die Fibrillen-assoziierten Kollagene IX und XI an Kollagen II, so dass der Mischfibrillendurchmesser auf 15-50 nm begrenzt wird. Es gibt eine starke Interaktion mit Proteoglykanen, z.B. Aggrecan, die aus dem höheren Anteil von Hydroxprolin, Glucose- und Galaktoseresten im Vergleich zu Kollagen I resultiert (Stevens A & Lowe J, 1997; Gelse K et al., 2003).

Kollagen II wird während der Osteochondrose von Chondrozyten im Periost exprimiert und gilt somit als Indikator für die Chondrogenese.

2.5.1.3 Kollagen III:

Dieses „Reparaturkollagen“ zählt ebenfalls zur Gruppe der fibrillären Kollagene. Es ist aus drei $\alpha 1$ (III)-Ketten aufgebaut und in Blutgefäßen (glatte Muskulatur), parenchymatösen Organen wie Lunge, Leber und Milz sowie Haut und Nerven zu finden (Löffler G & Petrides P, 1997).

Die Kollagen-III-Fibrillen sind dünner als die von Kollagen I, aber dehnbarer. So kann die Anwesenheit von Kollagen III eine Schwächung der Gewebsspannung und biomechanischen Belastbarkeit bewirken. Eine tragende Rolle besitzt Kollagen III während der Heilungsphase von Gewebedefekten. So wurde eine Anreicherung des Kollagens an rupturierten Achillessehnen beobachtet. Die Anreicherung soll auf repetitive Mikrotraumen und länger andauernde mechanische Überlastungen zurückzuführen sein (Eriksen H et al., 2002).

2.5.1.4. Kollagen X:

Kollagen X gehört zur Gruppe der Netzwerk-bildenden Kollagene und gilt als hoch spezialisiertes Kollagen. Kollagen X wird nur von hypertrophen Chondrozyten gebildet und ist somit ein Markerprotein für Mineralisationsprozesse bei der Regeneration von Knochen und Knorpel (Thomopoulos S et al., 2002; Galatz L et al., 2007). Unter physiologischen Bedingungen kommt es daher auch nur im Knorpel der Wachstumsfugen vor (Kühn K, 1986; Löffler G & Petrides P, 1997). Aufgebaut ist es ähnlich wie Kollagen III aus drei gleichen $\alpha 1$ -Ketten.

2.5.2. Die Proteoglykane

Proteoglykane sind neben den Kollagenen, Elastin und anderen Glykoproteinen Hauptbestandteil der EZM des Knorpels. Außerdem kommen sie als Proteine auf der Zelloberfläche vor und werden von Chondrozyten produziert und in die EZM sezerniert.

Das Proteingrundgerüst der Proteoglykane trägt eine Vielzahl von Seitenketten mit Glycosaminoglykanen. Die Seitenketten werden aus großen, unverzweigten Polysaccharidketten aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten gebildet. Diese werden je nach ihrem Disaccharid-Grundbaustein in Chondroitin-, Keratan-, Dermatan- oder Heparansulfat (kovalente Bindung an das Grundgerüst) bzw. die Hyaluronsäure unterschieden (keine kovalente Bindung; Stevens A & Lowe J, 1997; Deutzmann R et al., 2003). Die sich wiederholenden Disaccharideinheiten sind mehrfach negativ geladen und können so andere Moleküle (z.B. Wasser) reversibel binden. Dadurch verleihen die Proteoglykane dem Knorpel seine Elastizität (Ruoslahti E, 1988).

Aggrecan, das bedeutendste Proteoglykan im Knorpel, besteht aus dem Kernprotein mit ungefähr 100 Chondroitinsulfat- und 30 Keratansulfatseitenketten. Die dadurch erworbene hohe Ladungskonzentration ermöglicht es dem Aggrecan, ein hydratisiertes, hyperosmotisches und reversibel deformierbares Gel zu bilden. Im Knorpel bildet es zusammen mit der Hyaluronsäure, einem Glycosaminoglykan ohne Proteinanteil, große Aggregate. Das so genannte Link-Protein stabilisiert diese Aggregate. Aggrecan kann so zur Komprimierbarkeit des Knorpels beitragen (Fosang AJ et al., 1996; Roughley PJ, 2006; Flik KR, 2007). Außerdem ist Aggrecan an chondrogenen Transformationsvorgängen beteiligt. Kommt es durch Mutationen im Aggrecan-Gen zu einer reduzierten Knorpelbildung, endet dies für den Organismus tödlich (Deutzmann, R. et al. 2003).

2.6. Die Wachstumsfaktoren mit Einfluss auf die RM

Wachstum und Differenzierung von Chondrozyten und Osteoblasten werden von Wachstumsfaktoren der TGF β - und FGF-Familie reguliert, einer großen Gruppe hormonähnlicher Polypeptide mit mitogenen und differenzierenden Eigenschaften.

2.6.1. TGF- β

Dieser Wachstumsfaktor besitzt ein mittleres Molekulargewicht des Homodimers von 13 kD. TGF- β wird als inaktives bzw. latentes TGF- β gespeichert. Das mittlere Molekulargewicht des Homodimers beträgt 12,5 kD. TGF- β wird als inaktives bzw. latentes TGF- β gespeichert. Hauptspeicherorte sind Thrombozyten und Knochen. Der Wachstumsfaktor muss zur funktionellen Aktivierung aus dem Komplex freigesetzt werden. In vivo geschieht dies im Rahmen von Entzündungsreaktionen durch Makrophagen und bei der Knochenneubildung durch Osteoblasten. TGF- β wird in der Frühphase der Knochenheilung freigesetzt, reguliert dabei die Interaktion von Osteoklasten und Osteoblasten und hat somit einen anabolen Effekt (Roman-Blas JA et al., 2007). Eine verminderte Expression von TGF- β führt zu einer verringerten Osteoblastenrekrutierung und -differenzierung (Pfeilschifter J et al., 1990; Marie P, 1997; Summer DR et al., 2004).

Die Wirkung von TGF- β erfolgt über 2 verschiedene Serin-Threonin-Kinase-Rezeptortypen. Für die Signaltransduktion ist eine Phosphorylierung des Typ-I-Rezeptors nach Bindung von TGF- β -Dimeren an Typ-II-Rezeptoren und deren Interaktion mit dem Typ-I-Rezeptor notwendig. Intrazellulär wird das Signal von den Typ-I-Rezeptoren über so genannte smad Proteine weitergeleitet.

Die verschiedenen Isoformen von TGF- β induzieren neben der Bildung der EZM auch die Proliferation mesenchymaler und epithelialer Zellen.

Weiterhin fördert TGF- β die Synthese diverser Knochen- und Knorpelkomponenten (Roberts AB et al., 1986). TGF- β ist vermehrt in synovialen Zellen bei rheumatoider Arthritis zu finden und führt neben einer Stimulation der Hyaluronsynthese zu einer Gewebefibrosierung (Oguchi T et al., 2004; Sakai H et al., 2001). Erhöhte TGF- β -Werte lassen sich in gefäßreichen Geweben wie Tumor-, Wundheilungs- und Infarktgewebe sowie embryonalem Gewebe nachweisen (Westphal JR et al., 1993; Wang JM et al., 1995; Kumer P et al., 1996). Weiterhin konnte eine vermehrte Expressionen von TGF- β durch Makrophagen in der entzündlichen Phase der Sehnenheilung bei RM-Rupturen nachgewiesen werden. Dies

verbessert möglicherweise die mechanischen Eigenschaften den Sehnen durch Stimulation der Kollagensynthese (Bedi A, 2012). Neben dieser positiven Rolle wird für TGF- β andererseits eine negative Rolle bei der Sehneneinheilung nach Refixation der RM diskutiert, denn hohe initiale Werte von TGF- β in der Bursa subacromialis waren mit einer stärkeren Fibrose und Narbenbildung durch aktivierte Fibroblasten und einer daraus resultierenden Abnahme der Sehnenelastizität assoziiert (Sakai H, 2001; Würzler-Hauri C et al. 2007).

2.6.2. Bone Morphogenetic Proteins

Urist beschrieb 1965, dass durch die Injektion von demineralisierter Knochenmatrix eine Knochenbildung in Muskeln und subkutanem Gewebe induziert werden kann. Die de novo Osteogenese durch demineralisierte Knochenmatrix führten Urist und seine Mitarbeiter 1971 auf einen Glycoproteinkomplex zurück. Dieser wird als Bone morphogenetic protein (BMP) bezeichnet. Der Name soll die einzigartige Fähigkeit dieser Proteine hervorheben, Knorpel- bzw. Knorpelgewebe zu induzieren. Heute sind 15 verschiedene BMP's bekannt, die eine eigene Familie von Wachstumsfaktoren mit uneinheitlicher Nomenklatur innerhalb der TGF- β -Superfamilie darstellen (Wozney JM, 2002).

BMP-Untergruppen			
Gruppe 1	Gruppe 2/ OP-1	Gruppe 3	Gruppe 4/ GDF-5
BMP-2	BMP-5	BMP-3	BMP-12
BMP-4	BMP-6		BMP-13
	BMP-7		BMP-14/GDF-5
	BMP-8		
	DPP, 60 A		

Tab. 1: BMP-Untergruppen nach Wozney JM 2002

Zu der BMP-Familie zählen u. a. die osteogenetic proteins (OPs), growth and differentiation factors [GDFs, cartilage-derived morphogenetic proteins (CDMPs)] und die BMP-Homologe der Drosophila (DPP, 60A). BMP-2 und -4 bilden dabei aufgrund ihres vergleichbaren strukturellen Aufbaus eine Untergruppe. Zu der OP-1-Gruppe gehören BMP-5, -7 und -8. Proteine dieser beiden Untergruppen induzieren die Bildung von Knochen- und Knorpelgewebe, während die Untergruppe GDF-5 (GDF-5, BMP-12 und -13) eine wichtige Rolle in der Muskelformation spielt. BMP-3, auch Osteogenin genannt, bildet eine weitere

eigene Untergruppe. BMP-3 kann als BMP-Rezeptorantagonist fungieren und andererseits aber auch die Adipogenese stimulieren (Rosen V, 2006; Stewart A et al., 2010; Ducy P & Karsenty G, 2000; Balemans W & van Hul W, 2002; Wozney JM, 2002).

Als auto- und parakrin wirksame Mediatoren kontrollieren die BMPs grundlegende Prozesse während der embryonalen Musterbildung, z.B. die Ausbildung der Körperachsen und das Wachstum der Organe. Die BMPs steuern durch ihre pleiotropen Effekte auf verschiedenste Zelltypen prä- und postnatale Prozesse wie Differenzierung, Proliferation, Adhäsion sowie Apoptose. BMP-Nullmutationen führen zum Embryotod bzw. schweren Missbildungen (Kübler NR, 2006).

BMPs induzieren die osteochondrogene Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen sowie Sehnen- und Weichteilgewebszellen. Die Matrixzellen müssen dabei über bestimmte Mediatoren aktiviert werden. Dazu gehören Stoffe, die eine Chemotaxis und Migration von Progenitorzellen, die Aneinanderlagerung von Zellen mit Hilfe von Fibronectin sowie die Proliferation mesenchymaler Zellen anregen.

Die meisten der über 30 bisher bekannten BMPs treten als Dimere auf, die ein Molekulargewicht von ca. 18.5 kD aufweisen und jeweils durch 7 Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Wozney JM, 2002).

BMPs werden von eukaryontischen Zellen als Präproproteine synthetisiert, deren N-terminale Signalsequenz mit einem über 300 Aminosäuren langen cysteinfreien Propeptid und dem eigentlichen BMP aus 100-140 Aminosäuren verbunden ist. Nach dem Transport in das rER bilden 6 hochkonservierte Zystinreste in dem C-terminalen Kettenabschnitt der BMPs über 3 Disulfidbrücken den typischen Zystinknoten. Der letzte Reifungsschritt vor Abspaltung des Propeptids ist die N-Glycosilierung in ER und Golgi-Apparat. Das reife Protein wird dann nach Abschluss der posttranslationalen Modifizierung von den Zellen sezerniert (Wozney JM, 2002).

Die BMPs entfalten ihre Aktivität durch Bindung an transmembranäre heterodimere Rezeptorkomplexe. Die derzeit bekannten 2 Rezeptortypen mit ihren Subtypen gehören zur Gruppe der Serin-Threonin-Kinasen. Dem Rezeptortyp I (Subtypen: BMPR-1A, BMPR-1B, ActR-1A) wird eine besondere Bedeutung bei der Entwicklung der Extremitäten zugeschrieben. So soll der Subtyp IA die chondrozytäre Differenzierung regulieren und der Subtyp IB die initialen Schritte der Chondrogenese und Apoptose (Sanyal A et al., 2002). BMP-2 bindet mit hoher Affinität an den Rezeptor vom Subtyp IB. BMP-7 besitzt dagegen eine höhere Affinität zum Typ-II-Rezeptor (Subtypen: BMP-R-2, Act-R-2, Act-2B), an den auch TGF- β bindet (Pauly S, 2011; Schmal H et al., 2012).

Das dimere BMP-Molekül besitzt pro Monomer 2 Bindungsstellen an den Rezeptor. So entstehen oligomere Rezeptorkomplexe. Die weitere intrazelluläre Signaltransduktion führt dann über eine Signalkaskade zur Aktivierung der p38- oder Smad-Wege (Yu Y et al., 2007). Die smad Proteine (*immediate downstream Moleküle des BMP-Rezeptors*) werden vom BMP-Rezeptor phosphoryliert, lösen sich dann vom Rezeptor und binden an ein weiteres smad Protein, das smad 4 Molekül. Dieser Komplex transloziert anschließend in den Zellkern. Durch Bindung an die DNA kommt es schließlich zur Transkription des BMP-Zielgens (Kübler NR, 2006).

Der BMP-Signalweg kann durch eine Vielfalt verschiedener Liganden wie inhibitorische smads (smad 7) und Co-smads (smad 4) oder extrazelluläre Antagonisten wie Noggin und Chordin reguliert werden (Zhu W, 2006).

Durch ihren Einfluss auf die Knochen-Knorpel-Homöostase und -Reparatur sowie die Fähigkeit zur Induktion der de novo-Osteogenese werden die BMPs zu einer therapeutisch interessanten Wirkstoffklasse (Wozney JM, 2002). Anwendungsmöglichkeiten liegen vor allem in der Zahnmedizin und der Therapie der Osteoporose. BMP-haltige Trägermaterialien werden hauptsächlich in der Behandlung klinischer Problemfälle eingesetzt. Hierzu zählen die Deckung osteolytischer Defekte und größerer Knochendefekte nach Tumorexzision sowie die Behandlung schlecht heilender und infizierter Frakturen mit Pseudoarthrose-Bildung (Cullinane DM., 2002; Schmal H et al., 2012).

Bei Anwendung von BMPs verläuft vor allem das Frühstadium der Knochenbruchheilung mit Bindegewebs- und Brückenkallusbildung schneller und effektiver. Es wurde im Tierversuch nach Zugabe von rekombinantem BMP-2 eine frühzeitige Resorption des beschädigten Knochens beobachtet, der eine neue Knochenbildung folgte (Southwood L et al., 2003). Bei Frakturen werden osteoinduktive Zellen chemotaktisch in das frakturnahe Weichteilgewebe gelockt. Tierversuche belegen, dass eine ansonsten mehrere Monate in Anspruch nehmende Lückenschließung zwischen 2 Knochensegmenten durch BMP-haltige Trägermaterialien auf wenige Wochen verkürzt werden kann (Teixeira JO & Urist MR, 1998; Wang JS et al., 1993; Sumner DR, 2004).

Isoliert werden die BMPs aus Knochensubstanz. Jedoch ist die Form der Gewinnung teuer und kompliziert. Aus einem Kilogramm Knochen kann z.B. nur 1 µg Protein extrahiert werden. Außerdem beinhaltet der Extrakt neben den BMPs auch weitere nicht-kollagene Proteine aus dem Knochen, so dass im Anschluss eine Reinigung der BMPs erforderlich ist. Daher hat sich die rekombinante Erzeugung von BMPs durch rekombinante Genexpression in

E. coli und anschließende Renaturierung der BMPs aus sog. „inclusion bodies“ durchgesetzt (Ruppert R et al., 1996; Vallejo LF et al. 2002 und 2004; Southwood L et al., 2004).

Um den biologischen Effekt der hergestellten BMPs auszunutzen, sind in der Regel charakteristische Carriersysteme notwendig, z.B. Kollagen II. Ein Carrier-gebundenes BMP ist dann deutlich wirksamer bei der Induktion der Proliferation von Bindegewebezellen und der Bildung von Weichteilgewebeskallus (Sanyal A, 2002; Wozney JM, 2002).

Das osteoinduktive Potenzial der einzelnen BMPs ist unterschiedlich. Besonders hohes osteoinduktives Potenzial besitzen die BMPs -2, -4, -6, -7 und -9 (Cheng H et al., 2003). Interessant aus Sicht der Chondro- und Osteogenese sind dabei insbesondere BMP-2 und BMP-7 aufgrund ihrer stimulierenden Wirkung auf die Aktivität der Alkalischen Phosphatase sowie die Osteoblastendifferenzierung (Lories RJ et al., 2003; Majumdar MK, 2001; Shintani N, 2007; Bobacz K et al., 2008). Beide Moleküle sind ähnlich aufgebaut und besitzen neben einer α -Helix stark verdrehte antiparallele β -Faltblätter als kennzeichnendes Sekundärstrukturmerkmal. BMP-7 besitzt allerdings eine größere Monomer-Untereinheit besitzt (18 kD) als BMP -2 (16 kD).

2.6.2.1. BMP -2

Das dimere BMP -2-Molekül (Abb. 10) weist durch polare, d.h. geladene Seitenketten der beiden Untereinheiten einerseits hydrophile Eigenschaften auf, aber andererseits durch nicht polare Aminosäureseitenketten an der Oberfläche auch hydrophobe Eigenschaften.

BMP-2 gilt als hoch potenter Induktor der Knochenbildung in vivo und der Differenzierung von primären Osteoblasten in vitro (Ji X et al., 2000).



Abb. 10: Oberflächenstruktur von BMP-2 (aus: www.uscnk.com/img)

Als rekombinantes Protein ist BMP-2 ein sehr potenter Differenzierungsfaktor mit der Fähigkeit, die gesamte Knorpel- und Knochenformation auch außerhalb des Knochens zu induzieren. So kommt es zu einem erhöhten relativen Anteil von Cbfa-1-positiven-Zellen.

Dieser Transkriptionsfaktor ist ein Mitglied der RUNX-Familie und induziert die Expression spezifischer Gene zur Differenzierung von Osteoblasten (Kim HN, 2011; Seeherman H, 2006). Wird das Gewebe in der Umgebung von Osteotomien mit BMP-2 behandelt, kommt es zu einer Erhöhung des Prozentsatzes von Cbfa-1-positiven Zellen und einem schnelleren Heilen der Osteotomien (Southwood L, 2004; Seeherman H, 2006). BMP-2 wird weiterhin eine Rolle in der Chondrogenese, als Reparaturprotein, zugeschrieben. Eine erhöhte BMP-2-Expression konnte z.B. nahe der Reparaturzone des geschädigten Knorpels in arthrotisch veränderten Knien nachgewiesen werden, möglicherweise auf der Basis von erhöhtem mechanischen Stress (Schmal H et al., 2012). In Analogie könnte auch der erhöhte Druck auf die Bursa subacromialis bzw. die Sehnen der RM durch exogene Faktoren wie das Impingementsyndrom zu einer lokal erhöhten BMP-2 Expression beitragen. Interessanterweise besitzen BMPs neben ihrer Fähigkeit, Knochengewebe zu induzieren, weitere Funktionen in der Mutagenese und Onkogenese. So exprimieren 60% der Osteosarkome BMP-2 und -4. Im Serum von Patienten mit BMP-2- oder BMP-4-positiven Osteosarkomen werden hohe Mengen Alkalischer Phosphatase nachgewiesen. Auch in vielen malignen Chondrosarkomen und Ewing-Sarkomen sowie in benignen Osteoid Osteomen ist eine BMP-2, -4 und -6-Expression nachweisbar (Yoshikawa H, 2004). Die genannten BMPs wurden weiterhin in aus dem Knochenmark stammenden Megakaryozyten sowie in Blutplättchen nachgewiesen. Somit könnte die Osteosklerose bei Patienten mit einer myeloischen Leukämie durch die erhöhte Anzahl von Megakaryozyten und deren hohe BMP Produktion erklärbar sein (Sipe JB, 2004).

2.6.2.2. BMP -7

BMP-7 ist ein 35 kDa großes, homodimeres Protein und trägt auch den Namen Osteogenic protein-1 (OP-1) (Abb. 11).

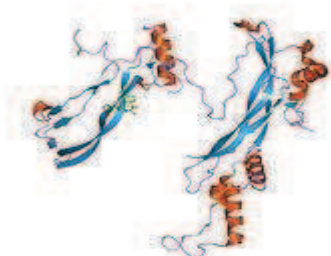


Abb. 11: Molekülstruktur von BMP-7 (aus: <http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/images/entry/1m4u600.png>)

BMP-7 kann wie BMP-2 dazu genutzt werden, die Einheilung des Implantates z.B. bei der Deckung von größeren Knochendefekten zu fördern. BMP-7 behandelte Träger- und Osteosynthesematerialien führen dabei zu einer vergrößerten Kalluszone ohne funktionelle und mechanische Defizite (Cullinane DM et al., 2002).

BMP-7 gilt als ein anaboler Faktor im Knorpel-Stoffwechsel, spielt eine sehr wichtige Rolle in der Knorpelregeneration und erhöht die Expression von Molekülen der EZM (Schmal H et al., 2012). Von zentraler Bedeutung ist BMP-7 im Lauf der Embryogenese bzw. Organogenese von Gehirn, Lunge, Herz, Leber und Milz. Während dieser Zeit ist die BMP-7-Expression in der Niere maximal und verantwortlich für die Induktion des nephrogenen Mesenchyms. Eine Null-Mutation von BMP-7 ist nicht mit dem Leben vereinbar (Ozkaynak E, 1991).

2.6.3. b-FGF

B-FGF (basic-FGF) gehört zu der aus mehr als 23 Mitgliedern bestehenden Familie der fibroblastic growth factors (FGFs). Wie bei den BMPs erfolgt auch bei diesem 25 kD großen dimeren Molekül die Signaltransduktion über Tyrosin-Kinase-Rezeptoren. Es gibt für die FGFs 4 verschiedene Rezeptortypen (FGFR1-4), die jeweils aus einer extrazellulären Region, einer transmembranösen Helix und einer intrazellulären Region mit Tyrosin-Kinase-Aktivität bestehen. Die Rezeptoren werden nach Bindung des FGF aktiviert und setzen intrazellulär eine Signalkaskade in Gang (Lee PL, 1989).

Neben den BMPs lenkt auch b-FGF die Entwicklung vieler Organe und des Skelettsystems (Broadley KN et al., 1989; Martin GR, 1998). So hat es z.B. nach Knorpelverletzungen eine mitogene bzw. differenzierende Wirkung auf Chondrozyten mit Stimulierung der Kollagen-II-Expression (Handa K et al., 1997; Nakajima F et al., 2001). Weiterhin ist b-FGF durch seine stimulierende Wirkung auf glatte Muskelzellen, endotheliale bzw. epitheliale Zellen und Fibroblasten wichtig in der Angiogenese sowie bei der Wundheilung und Bildung von Granulationsgewebe (Bedi A, 2012; Ishimaru T et al., 2013). Allerdings belegten andere in vitro Arbeiten auch inhibitorische Wirkungen von b-FGF auf Proliferations- und Migrationsvorgänge sowie die Kollagen-II Expression (Roberts AB et al., 1986, 1989, 1993; Kumar P et al., 1996; Desai S, 2001).

2.6.4. VEGF

VEGF stimuliert als Wachstumsfaktor die Gefäßneubildung und steigert außerdem die Gefäßpermeabilität (Zunahme von Ödemen). Die bisher 5 bekannten Isoformen (121, 145, 165, 189 und 206 kD) werden anhand ihres Molekulargewichts unterschieden sowie ihrer Fähigkeit, an Zelloberflächenproteine wie Proteoglycane und VEGF-Rezeptoren zu binden. Die VEGF-Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 gehören zur Familie der Thyrosin-Kinase-Rezeptoren und sind hauptsächlich auf Endothelzellen zu finden. Der VEGF-Rezeptortyp 3 wird auf Lymphgefäßen exprimiert. VEGF 121, 145 und 165 werden als glykosilierte Proteindimere sezerniert, z.B. von Wundmakrophagen. Die VEGF Isoformen 121 und VEGF 165 wurden bei Patienten mit RM-Rupturen vermehrt in der Bursa subacromialis exprimiert (Handa A et al., 2003). Die Isoformen 189 und 206 sind zellassoziiert (VEGF 189 bindet an Heparansulfat, ein Zelloberflächenproteoglycan, VEGF 206 ist fest in die Zellmembran integriert) und tragen zum Fortschreiten einiger Krebsarten bei, wie dem kleinzelligen Lungenkarzinom oder dem Colon- und Nierenzellkarzinom (Ferrara N & Gerber HP, 2001; Yanagisawa K et al., 2001; Pertersen W et al., 2002).

VEGF hat unter physiologischen (z.B. der Embryonalentwicklung und Wundheilung) oder pathologischen Bedingungen (z.B. Fortschreiten solider Tumore, diabetische Retinopathie bzw. rheumatoide Arthritis) einen essenziellen Einfluss auf die Angiogenese. Weiterhin hat VEGF eine große Bedeutung bei der Differenzierung hypertropher Chondrozyten, bei der weiblichen Reproduktion und während der enchondralen Ossifikation (Pelissier P, 2004).

Als Trigger für die vermehrte Expression von VEGF und dessen Rezeptoren gelten neben traumatischen Ereignissen (z.B. Achillessehnen- und RM-Rupturen) auch Entzündungen, hypoxische und hypoglykämische Zustände sowie degenerative Prozesse (z.B. chronische Tendinopathien, chronische sakrale Dekubiti und das Karpaltunnelsyndrom) (Hirata H et al., 2004). Gesunde Achillessehnen aus Erwachsene zeigen nur sehr geringe Mengen von VEGF (Pufe T et al., 2001). Durch erhöhte Stoffwechselleistungen (z.B. Entzündungsvorgänge) steigt der Bedarf an Blutgefäßen zum An- und Abtransport von entzündungsfördernden Zellen und Zytokinen bzw. von Abbauprodukten. In Patienten mit einem Impingementsyndrom konnten z.B. erhöhte Mengen von VEGF mRNA und Protein in den entzündlich veränderten Bursa subacromiales, speziell in den Gefäßwänden, nachgewiesen werden (Handa A, 2003). Die erhöhte VEGF-Expression korrelierte in weiteren Untersuchungen mit der Gefäßdichte bzw. der synovialen Proliferation in der Bursa subacromialis sowie dem Grad der Schulterbewegungsschmerzen (Yanagisawa K et al., 2001). Auch die Erhöhung des Druckes

auf die RM bzw. die Bursa beim Impingement könnte dabei zu einer Erhöhung der VEGF-Expression beitragen, in Analogie zur gesteigerten VEGF-Expression im osteoarthritisch-veränderten Knorpel bei Erhöhung des hydrostatischen Drucks auf das Knorpelgewebe (Pufe T et al., 2004; Enomoto H et al., 2003).

Es ist jedoch noch nicht geklärt, ob die erhöhte VEGF-Expression bei RM-Rupturen bzw. Impingementsyndrom zur Degeneration der RM oder eher zu ihrer Heilung beiträgt (Bedi A, 2012). Eine vermehrte VEGF-Expression führt nämlich einerseits zu einer verstärkten Vaskularisation und synovialen Proliferation, wodurch das mechanische Impingement verstärkt wird. Eine zunehmende Gewebeseinsprossung kann außerdem zu einer strukturellen Schwächung der RM führen (Yanagisawa K et al., 2001). Andererseits wurde im Tierexperiment eine höhere Sehnenkraft nach RM-Reparatur bei Gabe von VEGF gezeigt (Bedi A, 2012).

2.7. Pro-entzündliche Faktoren

Mehrere Untersuchungen zeigten bei RM-Rupturen hohe Expressionen von IL-1 β und TNF- α in der Bursa subacromialis und werteten dies als Zeichen einer chronischen Entzündung (Sakai H, 2001; Gotoh M et al., 2002; Blaine TA, 2005; Voloshin I, 2005; Ko JY, 2008). Weitere Autoren schlussfolgerten, dass es durch eine chronisch entzündete Bursa subacromialis zu Adhäsionen zwischen der Bursa subacromialis und der RM und damit zu Bewegungseinschränkungen kommt (Ko JY, 2008).

2.7.1. IL-1 β

IL-1 β gehört zur großen Gruppe der Interleukine. Synthetisiert wird IL-1 β von Entzündungszellen, Phagozyten, Lymphozyten, T-Helferzellen, Fibroblasten, Zellen der Gefäßwände (Epithelzellen). Jedes Interleukin hat spezifische Zielzellen. Die Zielzellen von IL-1 β sind Thymozyten, neutrophile Granulozyten, T- und B-Zellen sowie Gewebszellen (Roitt IM, 1995).

Die Funktionen von IL-1 β sind mannigfaltig. Es spielt z.B. eine große Rolle bei der Hämatopoese sowie Entzündungsvorgängen. Es werden Zellen zur weiteren Zytokinsekretion stimuliert und weitere Entzündungszellen chemotaktisch angelockt, so dass eine langfristige Expression von IL-1 β als Zeichen einer chronischen Entzündung angesehen werden kann.

So zeigten z.B. Patienten mit RM-Rupturen eine höhere IL-1 β -Expression in der Bursa subacromialis als Patienten mit einer Oberarmfraktur oder einer vorderen Schulterinstabilität (Voloshin I, 2005).

Auf die Kollagen II- und Proteoglykansynthese hat IL-1 β eine hemmende Wirkung. Hinzu kommt eine schädigende und teils destruierende Wirkung auf Gelenk- und Faserknorpel und eine stimulierende Wirkung auf Osteoklasten durch Oligomerisierung des Rezeptors mit dem so genannten IL-1-receptor accessory protein und eine nachfolgende Zellaktivierung (Bühling KJ, 2000; Gotoh M et al., 2002).

2.7.2. TNF- α

TNF- α gehört wie IL-1 β zu den proentzündlichen Zytokinen. TNF- α wird freigesetzt, wenn der Körper mit Krankheitserregern in Kontakt kommt. Wie VEGF hat TNF- α außerdem eine große Bedeutung bei der Angiogenese und Wundheilung.

Auch bei traumatischen Ereignissen wie einer RM-Ruptur bzw. Entzündungen, wie einer Bursitis subacromialis, wird TNF- α vermehrt gebildet und kann dann auch die Expression von VEGF induzieren, um den gesteigerten Bedarf an Blutgefäßen abzudecken. Durch die Angiogenese wird dabei die erhöhte Stoffwechselaktivität und Sauerstoff- bzw. Nährstoffzufuhr aufrecht erhalten sowie die Einwanderung von neuen Entzündungszellen und der Abtransport von Abbauprodukten ermöglicht. Als Circulus vitiosus führt die vergrößerte Oberfläche der Blutgefäße dann wiederum zu einer vermehrten Produktion von Zytokinen wie TNF- α (Roitt JM, 1995; Bedi A, 2012). Im Tiermodell konnte so tatsächlich gezeigt werden, dass die Hemmung der Entzündungskaskade durch frühzeitige Blockade von TNF- α die biomechanische Kraft einer operativ versorgten RM-Ruptur verbessern kann (Gulotta LV, 2011).

3. Problemstellung

Periartikuläre Schultergelenkserkrankungen haben eine sehr hohe Prävalenz in der Bevölkerung und sind mit großen Schmerzen und Bewegungseinschränkungen verbunden.

Die Bursa subacromialis ist bei periartikulären Schultererkrankungen entzündlich bzw. degenerativ verändert und könnte durch die lokale Expression von Entzündungsmediatoren bzw. Wachstumsfaktoren und Kollagenen degenerative Veränderungen in den Sehnen der Rotatorenmanschette fördern. Bei periartikulären Schultererkrankungen im Bereich der Sehnenansatzzone der RM zu einer chondroiden Metaplasie mit einer Transformation von Tenozyten zu Chondrozyten kommt. Diese chondroide Metaplasie kann dann weiteren Verlauf zu einem Verlust an Elastizität in den Sehnen und zu Rupturen der RM beitragen.

Die vorliegende Arbeit hatte daher das Ziel, die Rolle der Bursa subacromialis in der Genese periartikulärer Erkrankungen des Schultergelenkes detailliert zu untersuchen.

Folgende Fragestellungen sollten in der Arbeit analysiert werden:

- Tritt bei traumatischen und degenerativen periartikulären Schultererkrankungen auch in der Bursa subacromialis eine chondroide Metaplasie bzw. Entzündung auf?
- Besitzt die chondroide bzw. osteogene Metaplasie, neben den bekannten extrinsischen (Trauma, Einengung des subacromialen Raumes) und intrinsischen Faktoren (Alterungs- und Degenerationsprozesse) eine Rolle in der Pathogenese periartikulärer Schultererkrankungen?
- Gibt es regionale Unterschiede in der Bursa subacromialis und können sich daraus Therapieoptionen zum Umgang mit der Bursa subacromialis (Resektion oder Belassen der Bursa) bei operativen Eingriffen ableiten?

Zur Beantwortung der Fragen wurde die Bursa subacromialis in 3 Bereiche unterteilt; den acromionnahen, zentralen und acromionfernen Abschnitt. Diese Abschnitte wurden histologisch, molekularbiologisch und biochemisch beurteilt.

Um Anzeichen der chondroiden Metaplasie zu bewerten, wurden die Abschnitte der Bursa die mRNA-Expression und Synthese verschiedener Wachstumsfaktoren (TGF- β ; BMP-2, BMP-7, b-FGF, VEGF) sowie die Aktivität der Alkalischen Phosphatase untersucht.

Um fibrosierende und proliferative Prozesse in der Bursa subacromialis zu beurteilen, erfolgte die Untersuchung der Matrixsynthese durch Analyse der mRNA-Expression und Synthese verschiedener Matrixmoleküle (Kollagen I, II, III, X und Aggrecan).

Problemstellung

Um entzündliche Veränderungen zu beurteilen, wurden die mRNA-Expressionen der Entzündungsmediatoren IL-1 β und TNF- α untersucht.

Die gewonnenen Ergebnisse sollten zum besseren Verständnis der komplexen Pathogenese von periartikulären Krankheitsbildern des Schultergelenkes beitragen und als Grundlage für weitere therapeutische Empfehlungen v.a. im operativen Umgang mit der Bursa subacromialis dienen.

4. Materialien und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Laborgeräte und allgemeiner Laborbedarf

Brutschrank 400	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Einmalhandschuhe Einmalskalpell, chirurgisch (#10, #11)	NOBA Verbandsmittel Danz GmbH & Co. KG, Wetter Aesulap. B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Autoklav Systec V-120	Systec GmbH Labortechnik, Wettenberg
Gelkammer	Bio-Rad Mini-Sub® Cell; Bio-Rad Laboratories, München
Gefrier-/Kühlgeräte: Gefriertruhe (-80°C) GS 801 (-20°C) Kühlschrank KT 1740 Eismaschine Scotsman	Nunc GmbH & Co. KG., Karlsruhe Liebherr-Hausgeräte BmbH, Ochsenhausen Liebherr-Hausgeräte GmbH FRIMON AF 80 WS; Scotsman, Mailand, Italien
Histokinette Shanon Citodel 100	Shandon Scientific Ltd., Cheshire, UK
Kryostat Leica CM 1100 Kühlplatte Leica EG 1130	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar Leica Microsystems CMS GmbH
Objektträger SuperFrost® beschichtet	Menzel, Braunschweig
Microtom Typ HM 355	Walldorf, Deutschland
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Jena
Paraffinbehälter mit Wärmeplatte Leica EG 1120	Leica Microsystems CMS GmbH
PCR-Maschine	Eppendorf AG, Hamburg
Master Cycler Gradient	Eppendorf AG
PCR-Tube 0,5 ml Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf AG
Pipetten: Research® 2,5, 10, 100, 1000, 5000 µl Reference® 10, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf AG Eppendorf AG
Thermostat plus	Eppendorf AG
UV – Illuminator Bio-Rad Flour-STMMultimager	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vortexer Vortex-Genie 2® 560E	Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y., USA
Waagen: Analysewaage Sartorius BP 121 S Kern GS 4100 – 2	Sartorius AG, Göttingen Kern Techlab GmbH, Ekkerode
Wasser: Nukleasefrei Ampuwa®	Promega Corporation, Madison, WI, USA Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Wasserbad WB 22	MEMMERT gmbH % Co. KG, Schwabach
Zentrifugen: MiniSpin® mit Rotor F45-12-11 Centrifuge 5415D, Rotor F45-24-11	Eppendorf AG Eppendorf AG

4.1.2. Chemikalien

2-Propanol	Merck KGaA, Darmstadt
Agarose	Bio-Rad Laboratories, München
β -Mercaptoethanol	Merck KGaA
Chloroform	Merck KGaA
DNA-Marker	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Essigsäure	Merck KGaA
Ethanol	Apotheke KIM, Universitätsklinikum Jena
Ethidium Bromid	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natrium Chlorid (NaCl)	Merck KGaA
EDTA	Merck KGaA
Glycerol	Merck KGaA
Methanol	Merck KGaA
Orange G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Paraformaldehyd	Merck KGaA
Paraffin Paraplast Plus	Merck KGaA
Stickstoff	Linde, Pullach
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan	Merck KGaA
Trizol	Invitrogen / Life technologies GmbH, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA
Xylol	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig

4.1.3. Enzyme und Proteine

Albumin Fraktion V	Merck KGaA
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich
RNAse Out	Merck KGaA

4.1.4. Farbstoffe

Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Merck KGaA
5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat (BCIP)	Merck KGaA
Eosin	Dr. Hollborn & Söhne, Leipzig
DAPI (4', 6-Diamidino-2-Phenylindol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Hämatoxylin (nach Gill)	Dr. Hollborn & Söhne
Kernechtrot	Dr. Hollborn & Söhne
Lichtgrün	Dr. Hollborn & Söhne
Ponceau Säurefuchsin-Lösung	Dr. Hollborn & Söhne
2E 032 Eisen-Haematoxylin A	Waldeck GmbH & Co. KG, Division
2E 052 Eisen-Haematoxylin B	Chroma®, Münster

4.1.5. Antikörper

Anti-Kollagen II	Calbiochem®-Novabiochem Corporation, San Diego, CA, USA Polyclonal rabbit anti-human/rat/mouse 500 µg/ml
Anti-Kollagen X	Sigma-Aldich, Saint Louis, MI, USA monoclonal mouse anti-collagen X 500 µg/ml; clone Col-10
Anti-BMP -2	R&D Systems, MN, USA monoclonal mouse anti-human 500 µg/ml; clone BMP-2
Anti-BMP -7	R&D Systems, MN, USA monoclonal mouse anti-human 500 µg/ml; clone BMP-7

4.1.6. Test-Kits

Antifade Kit	Antifade Kit, MoBiTec, Göttingen
Hot Star Master Mix	Quiagen Promega Corporation, Madison, WI, USA
Omniscript®RT Kit	Quiagen Promega Corporation
RNA- Isolation Nucleo Spin®RNA II	Manchery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

4.1.7. Herstellung von Puffern und Lösungen

Folgende Puffer wurden hergestellt (Angaben für jeweils einen Liter):

- PBS (pH 5,0):

6,66 μmol Na_2HPO_4 (1,186 g) + 14,46 μmol KH_2PO_4 (0,2 g) + 2,67 μmol KCl
(0,2 g) + 136,9 μmol NaCl

- TBE:

0,1 mol Tris (12,4 g) + 1,8 μmol EDTA (0,74 g) + 0,09 mol H_3BO_3 (5,6 g) + a.d.

- TBS (pH 7.5):

50 mM Tris (6 g) + 150 mM NaCl (9 g) + a.d.; mit HCl auf pH 7.5 einstellen.

- Elektrophorese Puffer:

300 ml TBE + 15 μl EthBr

- Hämatoxylin-Lösung:

2 g Hämatoxylin (in 20 ml 100% Ethanol gelöst) + 0,4 g NaIO₃ + 100 g $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
+ 100 g $\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl}_3\text{O}_2$ + 2 g Zitronensäure + 2 l a.d. gelöst, bei Raumtemperatur zur Reifung
aufbewahrt.

- Eosin- und Safranin-O-Lösung:

je 10 g Eosin bzw. Safranin-O + 300 ml 95%-igem Ethanol

4.1.8. Computersoftware

Photografie Adobe Photo Shop 5.0 und 7.0	Adobe Systems, Inc
EndNote6	Literaturverwaltung
Mikroskopsteuerung Axiovert Vision 3.0	Carl Zeiss vision GmbH
Statistikprogramm SPSS 14.0	SPSS Inc., Chicago, USA
Quantifizierungsprogramm für Gele Scion imagine Release beta 4.0.2	Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA

4.2. Methoden

4.2.1. Entnahme der Präparate

4.2.1.1. Entnahme der Bursa subacromialis

Es wurden die Bursae subacromiales von insgesamt 31 Patienten mit chronischen, therapieresistenten periartikulären Schulterbeschwerden untersucht (Tab. 1), die innerhalb eines Jahres am Lehrstuhl für Orthopädie des Universitätsklinikums Jena operiert wurden. Das Alter dieser Patienten lag zwischen 38 Jahren und 74 Jahren (durchschnittlich $57,1 \pm 7,7$ Jahre).

Eine Aufklärung sowie das Einverständnis der Patienten zur weiteren labor- und biochemischen Untersuchung lagen vor (Ethikkommissionsnummer #0981-10/02).

Die Indikation zur operativen Therapie wurde nach orthopädischer Untersuchung und entsprechenden weiteren diagnostischen Maßnahmen wie röntgenologischen Untersuchungen, Sonografie und MRT sowie nach Ausschöpfung aller konservativen Therapiemöglichkeiten gestellt.

Der Patient wurde in der so genannten Beach-Chair-Position, einer halbsitzender Stellung gelagert und erhielt eine perioperative Antibiotika-Prophylaxe. Nachteil dieser Lagerung ist die unphysiologische Kopf- und Nackenposition des Patienten. Um postoperative Beschwerden zu vermeiden, muss der Kopf des Patienten in einer speziellen Lagerungsschale gebettet werden. Der Vorteil dieser Lagerung ist aber, dass keine ausgedehnten Umlagerungsmaßnahmen und neues steriles Abwaschen und –decken erforderlich sind, wenn nach erster arthroskopischer Inspektion die Entscheidung zum weiteren offen-operativen Vorgehen getroffen wird.

Patient	Alter	Geschlecht	Seite	Ruptur (Muskel)	Weitere periart. Erkrankung	Trauma	Verkalkung	Entzündung
1	59	M	Li	Komplett SSP	-	-	0	k.A.
2	66	W	Li	Partiell SSC Komplett SSP Partiell SSC	-	Ja	0	Deutlich
3	63	M	Li	Partiell SSP	-	-	0	Deutlich
4	38	W	Re	Partiell SSP, SSC	Chron. Ventr.Instabilität	Ja	0	Deutlich
5	57	W	Re	Komplett SSP Partiell SSC	Knöch. Impingement	-	0	k.A.
6	67	W	Re	Komplett SSP	-	-	0	k.A.
7	62	M	Li	-	Tendinitis calcarea	-	3	Deutlich
8	66	W	Re	Komplett SSP	Knöch. Impingement	-	0	Deutlich
9	63	M	Re	Partiell SSP	Knöch. Impingement	-	0	Deutlich
10	58	M	Re	Partiell SSP	-	-	0	Deutlich
11	51	M	Re	Komplett SSP	-	Ja	0	k.A.
12	51	M	Re	Komplett SSP	-	-	0	k.A.
13	55	M	Li	-	Tendinitis calcarea	-	-	Deutlich
14	61	W	Re	Komplett SSP Partiell IFS	-	Ja	-	k.A.
15	51	M	Re	Komplett SSP	Knöch. Impingement	Ja	1	Deutlich
16	64	W	Re	Komplett SSP	Knöch. Impingement	Ja	-	Deutlich
17	50	M	Re	Komplett SSP	-	-	1	Deutlich
18	64	W	Re	Komplett	Knöch. Impingement	Ja	-	Deutlich
19	55	M	Li	Komplett SSP Partiell IFS	Knöch. Impingement	Ja	1	Deutlich
20	60	M	Re	Komplett SSP, IFS, SSC	Knöch. Impingement	-	0	k.A.
21	50	M	Re	Komplett SSP Partiell IFS	-	-	0	Deutlich
22	56	W	Li	Komplett SSP, IFS	Knöch. Impingement	Ja	2	Deutlich
23	64	M	Re	Komplett SSP	-	-	1	Mäßig
24	74	M	Li	Komplett SSP	-	-	2	Deutlich
25	68	M	Li	Partiell SSP	-	-	1	Deutlich
26	49	M	Li	Komplett SSP, IFS	-	-	1	k.A.
27	64	M	Li	-	Tendinitis calcarea	-	3	Deutlich
28	62	M	Li	Komplett SSP	Tendinitis calcarea	-	1	k.A.
29	55	W	Li	-	Tendinitis calcarea	-	3	Deutlich
30	45	W	Re	Komplett SSP	-	Ja	-	Deutlich
31	55	M	Re	-	Tendinitis calcarea	-	3	k.A.

Tab. 2: Patientenübersicht

M=männlich; W=weiblich; der Verkalkungsgrad beschreibt sichtbare Kalzifizierungen in den konvent. Röntgenaufnahmen im Bereich der RM (0=keine Verkalkung; 1=geringe Verkalkung; 2=mäßige Verkalkung; 3=starke Verkalkung); der Schweregrad der Bursitis subacromialis wurde makroskopisch erhoben (keine; mäßig; deutlich; k.A.=keine Angaben)

Der Arthroskopiezugang zur Schulter erfolgte von dorsal. Mit einem spitzen Skalpell wurde die Haut ca. 1 cm medial und inferior zur posterolateralen Acromionbegrenzung inzidiert und der Arthroskopieschaft mit stumpfen Trokar durch die Subkutis, Deltoidfaszie und den M. deltoideus in Richtung Humeruskopf bis auf die Gelenkkapsel vorgeschoben. Der Gelenkinnenraum wurde nach Spülung mit Ringerlösung mit Hilfe eines Arthroskops dargestellt und die Knorpelverhältnisse am Humeruskopf, die gelenknahe Rotatorenmanschette, die lange Bizepssehne, das Glenoid sowie die Synovialis beurteilt, die im gesunden Zustand glatt mit leichter Gefäßinjektion erscheint. Die ventralen und dorsalen Anteile der Rotatorenmanschette konnten durch Rotationsbewegungen des Arms besser eingesehen werden. Anschließend erfolgte die endoskopische Inspektion des Subacromialraums mit Betrachtung des Lig. coracoacromiale, der Bursa subacromialis, der Ansätze der RM am Tuberculum majus und der Unterfläche des ACG mit seinem synovialen Überzug. Durch fächerförmige Bewegungen des Trokars konnten Verwachsungen leicht gelöst werden. Mit Hilfe eines Shavers konnten Verklebungen und synoviale Zotten entfernt werden. Die Entnahme der Bursa subacromialis erfolgte bei rein arthroskopischen Operationen zum Teil mit motorgetriebenen Instrumenten und zum Teil mit Stanzen, um eine intakte Bursa zu erhalten.

Wenn eine offene Rekonstruktion der Rotatorenmanschette erforderlich war, wurde ein Mini-Open-Zugang über der anterioren-lateralen Acromionkante und mit stumpfer Durchtrennung des M. deltoideus und weiterer schichtweiser Präparation durchgeführt. Die Bursa subacromialis wurde anschließend mobilisiert und reseziert. In vergleichbarer Technik wurden bei einer Tendinitis calcarea die Kalkherde aufgesucht und entfernt.

Lag ein mechanisches Impingement vor, wurde nach der Bursektomie der Acromionsporn entfernt und der subacromiale Gleitraum mit motorgetriebenen Fräsen erweitert.

Bei Rupturen der Rotatorenmanschette wurden die entsprechenden muskulären Rupturränder dargestellt, débridiert und durch Naht oder transossäre Fixation versorgt.

Die entnommenen Bursae (Länge ca. 7,5 mm) wurden im Operationssaal für die weitere Verarbeitung in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und auf Trockeneis für ca. 10 min. zwischengekühlt. Der acromiale Pol der Bursa wurde zur anatomischen Orientierung mittels Faden markiert.

Im nächsten Schritt wurden die Bursen in Längsrichtung geschnitten. Ein Längsschnitt wurde in TissueTek® O.C.T. eingebettet und für die weitere histologische Untersuchung auf

Trockeneis gefroren. Der zweite Längsschnitt wurde zur weiteren molekularbiologischen Untersuchung entsprechend der ursprünglichen anatomischen Lage in die Segmente acromionnah, zentral und acromionfern gedrittelt (Größe jeweils ca. 2,5 mm). Die Proben wurden dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.1.2. Entnahme von synovialen Gewebe

Die Bursa subacromialis, die von einer synovialen Membran ausgekleidet ist, ist bei pathologischen Veränderungen im subacromialen Raum in der Regel mit betroffen und reaktiv verändert.

Für den histologischen bzw. biochemischen Vergleich von gesundem und verändertem synovialen Gewebe wurde daher Synovialgewebe aus anderen Gelenken genutzt, da gesunde Bursa subacromiales nur in nicht verletzten Schultern zu finden sind.

Für den histologischen Vergleich wurde eine gesunde Bursa trochanterica der Hüfte genutzt und für die PCR gesunde Synovialmembranen.

4.2.2. Histologische Auswertung

4.2.2.1. Herstellung und Vorbehandlung von Gewebeschnitten

Der Teil der Bursa, der für die histologische Weiterverarbeitung vorgesehen war, wurde in Tissue Tec® eingebettet und bis zum Färben bei -80°C gelagert. Tissue Tec®, eine Mischung aus Harz und wässrigen Glykolen, dient während des Schneidens als Umgebungsmatrix und hinterlässt keine störenden Rückstände auf dem Objektträger.

Das Schneiden von 5 und 8 µm dicken Schnitten erfolgte im Kryostat bei -30°C. Die Schnitte wurden anschließend über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Objektträger getrocknet.

Die Kryoschnitte wurden als Vorbehandlung für die Färbungen mit Hämatoxylin-Eosin kurz mit TBS angefeuchtet.

4.2.2.2. Färbungen

Die Schnitte (8 µm) wurden mit der Lösung für die Hämatoxylin-Eosin Färbung behandelt. Diese wurden gebrauchsfertig von der Firma „Dr. H. Hollborn & Söhne, Leipzig“ bezogen. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (H&E) wurden angefertigt, nachdem die Gefrierschnitte über Nacht getrocknet waren.

Nach dem Färben mit Hämatoxylin nach Gill für 10 Minuten und Waschen der Schnitte mit a.d. und mit lauwarmen Wasser zum Bläuen, wurden im zweiten Schritt die Schnitte schließlich für 10 min mit Eosin gefärbt (10 g Eosin in 1 l a.d. verdünnt). Nach einem erneuten Waschen mit a.d. wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% → 96% → 96% → 100%) dehydriert. Nach je zwei 10-minütigen Waschschritten in Xylol erfolgte die Eindeckung mit Canada Balsam.

4.2.2.3. Immunhistochemie

Die Immunfluoreszenz wurde genutzt, um die Wachstumsfaktoren BMP-2 und -7 sowie die Kollagene I, II und X spezifisch darzustellen.

Der Farbstoff Fluoreszein ist an den Sekundärantikörper gebunden (Lottspeich und Zorbas, 1998) und dient dem Nachweis des Erstantikörpers mittels Immunfluoreszenz.

Um spezifische Epitope zu demaskieren und sichtbar zu machen, müssen diese vor Inkubation der Gewebeschnitte mit dem Erstantikörper enzymatisch demaskiert werden.

Für BMP-2 und BMP-7 erfolgte dazu eine Fixierung mit 4% PFA für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden die 5 µm dicken Schnitte jeweils 5-mal für je 5 Minuten mit PBS gewaschen. Der Verdau wurde dann mit 0,1%-iger Hyaluronidase in PBS für 30 weitere Minuten bei 37°C durchgeführt. Es folgten wieder mehrere Waschschriffe mit PBS.

Als Antikörper für BMP-2 wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper der Firma R&D Systeme genutzt (R&D Systems, Wiesbaden, Nordenstadt, Deutschland) (MAB355; Gesamtkonzentration von 2,5 µg/ml) und für BMP-7 ein entsprechender monoklonaler Antikörper (MAB3541; Gesamtkonzentration von 40 µg/ml).

Die Schnitte wurden nun mit dem jeweiligen Erstantikörper beschichtet (Verdünnung für BMP-2 1:20 in Tris-Puffer mit 3 g/100 ml Albumin; Verdünnung für BMP-7 1:50 in Albumin Tris) und bei 4°C über Nacht inkubiert.

Nach 5 Waschvorgängen à 5 min mit PBS wurden die Schnitte aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Zweitantikörper im Dunkeln für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert: für BMP-2 ein grünfluoreszierender, FITC-markierter Anti-Maus Antikörper in 1:100 TrisAlbumin-Verdünnung und für BMP-7 ein rotfluoreszierender, Rhodamin-markierter Antikörper in 1:100 TrisAlbumin-Verdünnung.

Wieder folgten Waschschriffe mit PBS und H₂O (a.d.). Danach wurden die Schnitte in trockenem Zustand mit dem AntiFade-Kit eingedeckt.

Parallel dazu erfolgten Kernfärbungen mit DAPI (10 µg/ml a.d.) zur besseren Identifikation einzelner Zellen. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur in Dunkelheit für 5 min mit der Lösung beschichtet. Nach 2 Waschungen mit a.d. wurden die Schnitte durch Trockentupfen auf einer Heizplatte bei 50°C getrocknet. Abschließend erfolgte die Eindeckung der Schnitte mit AntiFade-Kit.

Daneben wurde Kollagen II mit einem Mausantikörper der Fa. Calbiochem® (MAB 234187) immunhistologisch angefärbt.

Nach dem Verdau mit Hyaluronidase in PBS für 60 Minuten bei 37°C und den Waschschritten mit PBS erfolgte die Beschichtung mit dem Erstantikörper über Nacht bei 4°C (Verdünnung 1:50 TrisAlbumin-Verdünnung). Nach anschließendem Waschen wurden die Schnitte für 3 Stunden bei Raumtemperatur im Dunklen mit dem Zweitantikörper inkubiert (grünfluoreszierender, FITC-markierter Anti-Maus Antikörper; Verdünnung 1:100). Nach den Waschvorgängen mit PBS und a.d. erfolgte wieder die Eindeckung mit AntiKade-Kit im trockenen Zustand.

Die immunhistologische Färbung von Kollagen X erfolgte mit einem monoklonalen Maus-Antikörper der Firma Sigma (MAB C7974).

Die Schnitte wurden (pH 6,2) für 20 Minuten bei 80°C mit Zitronensäure vorbehandelt und anschließend mit PBS gewaschen. Dann erfolgte wiederum der Verdau für 30 Minuten bei 37°C mit Hyaluronidase und ein Waschschriff mit PBS. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Erstantikörper beschichtet (Verdünnung 1:500 in TrisAlbumin) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Abwaschen mit PBS folgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (grünfluoreszierender, FITC-markierter Anti-Maus Antikörper; 1:100 Verdünnung) bei Raumtemperatur für 3 Stunden. Die Eindeckung erfolgte wie bei den anderen immunhistologischen Färbungen nach den Waschschriffen und Trocknen auf der Heizplatte mit dem AntiFade-Kit.

4.2.2.4. Enzymhistochemie

Die Aktivität und Lokalisation von Alkalischer Phosphatase wurde mit Hilfe der Enzymhistochemie nachgewiesen. Damit konnten Hinweise auf eine mögliche chondroide Metaplasie erhoben werden.

Der Schnitt wurde mit einer Pufferlösung (NBT-BCIP-Puffer; Nitroblau-Tetrazoliumchlorid/5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat) überschichtet. Die Farbstoffe der Pufferlösung sind hell-gelblich und wasser- und lipidlöslich. Die Pufferlösung hat einen alkalischen pH-Wert (pH 9,5). BCIP dient als Substrat für die alkalische Phosphatase und wird nach Dephosphorylierung durch Oxidation in einen unlöslichen blauen Farbstoff überführt, der am Ort seiner Bildung ausfällt. NBT dient dazu als Oxidationsmittel. Die Reaktion findet im alkalischen pH-Bereich (pH 9,5) statt.

Die Einwirkzeit der Pufferlösung auf dem Schnitt betrug 10 min bei Raumtemperatur. Nach einem Waschvorgang mit Wasser wurde der Schnitt bei 60°C getrocknet. Nach Inkubation mit Xylol wurde der Schnitt mit Canadabalsam eingedeckt.

4.2.3. Auswertung der histologischen Schnitte

Die Bursa subacromialis wurde in drei Abschnitte unterteilt (acromionnah, zentral, acromionfern; Abb. 12), die histologisch ausgewertet und verglichen wurden.

Es ist jedoch anzumerken, dass lediglich der exponierte Anteil der Bursa subacromialis für die chirurgische Extraktion zugänglich war, d.h. der acromionnahe Bereich repräsentiert das Gewebe unter der Acromionspitze.

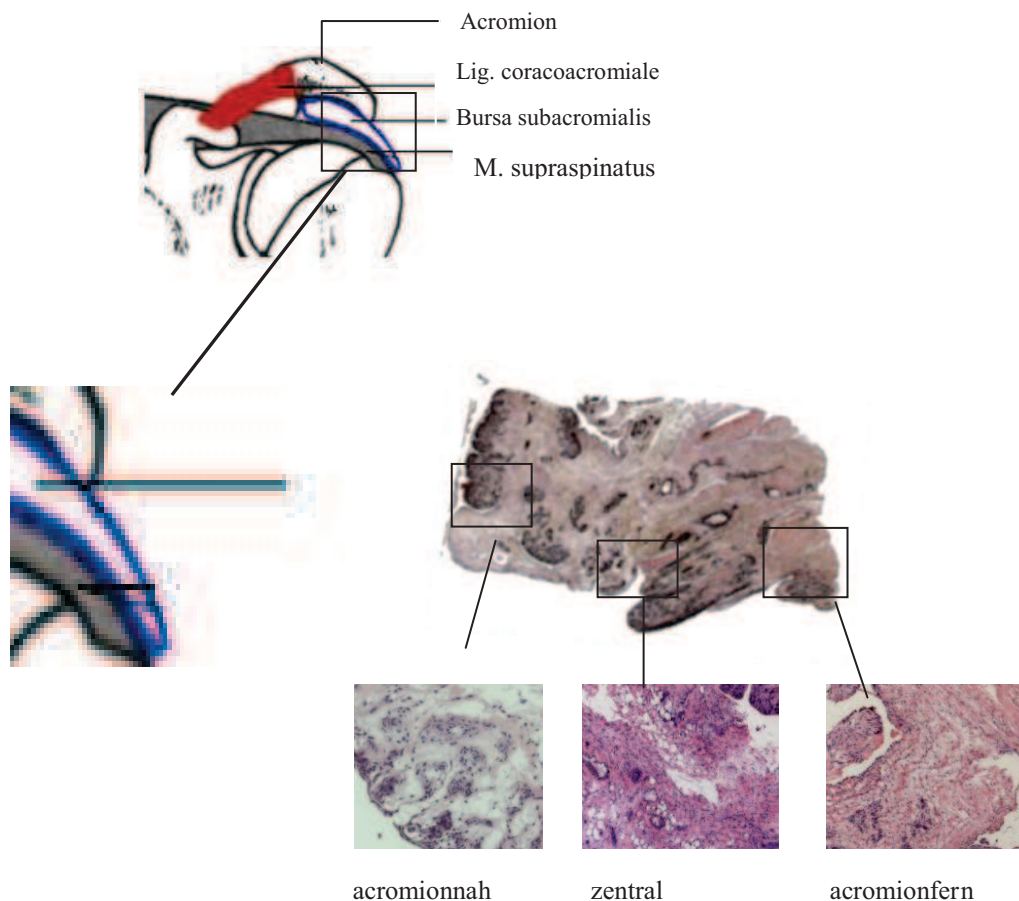


Abb. 12: Längsschnitt und Teilbereiche der Bursa subacromialis

Gezeigt ist der exponierte Anteil der Bursa subacromialis, der für die chirurgische Extraktion erreichbar war und in die 3 Abschnitte unterteilt wurde

Für die histologische Beurteilung der pathologischen Veränderungen wurden im Vergleich zu der normalen Bursa trochanterica folgende Kriterien definiert:

Verdickung der jeweiligen Kapselregion	(nein=0; ja=1)
Verdichtung der Struktur des Bindegewebes	(keine=0; wenig=1; mäßig=2; stark=3)
Vermehrtes Auftreten von Gefäßstrukturen	(keine=0; wenig=1; mäßig=2; stark=3)
Vermehrtes Auftreten von Drüsenstrukturen	(keine=0; wenig=1; mäßig=2; stark=3)
Auftreten von Fettvakuolen	(keine=0; wenig=1; mäßig=2; stark= 3)
Auftreten von sehnenähnlichen Strukturen	(nein=0; ja=1).

Die Ergebnisse für die einzelnen Teilbereiche wurden miteinander verglichen und mit Hilfe des Wilcoxon-Tests bezüglich statistischer Unterschiede bewertet. Unterschiede mit einem $p \leq 0,05$ wurden als statisch signifikant angesehen.

4.2.4. Polymerasekettenreaktion

4.2.4.1. RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus dem Bursagewebe bzw. aus den gesunden Synovialmembranen wurde gemäß des Protokolls der Firma Invitrogen durchgeführt.

Die tiefgefrorenen Gewebstücke wurden dafür in jeweils 1 ml Trizol homogenisiert (TRIzol™-Reagenz; Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Nach Zentrifugation (12000 rpm/10 min) und Aliquotierung wurden dem Überstand 200 µl Chloroform zur Ausfällung zugesetzt. Nach kräftigem Schütteln, 3 min Absetzen bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation (12000 rpm/15 min) wurde die wässrige Phase abpipettiert. Dann wurden 500 µl von 2-Propanol zugefügt. Nach 10- minütigem Absetzen und 10-minütiger Zentrifugation (12000 rpm) wurde das RNA-Pellet 2-mal mit Ethanol (75%) gewaschen und jeweils zentrifugiert (je 5 min/75000 rpm).

Das Pellet wurde dann bei 40°C getrocknet. Anschließend wurde das Pellett in 25 µl RNase-freiem Wasser gelöst und die RNA-Ausgangskonzentration mit einem Spektralphotometer bei 260 nm gemessen.

4.2.4.2. Reverse Transkription

Die Umschreibung der RNA in cDNA wurde nach dem Protokoll der Firma Invitrogen durchgeführt. Entsprechend dem RNA-Gehalt wurden die Verhältnisse des Reaktionskits des Herstellers beibehalten.

Nach der Denaturierung (6 min bei 65°C) erfolgte die Inkubation mit RT Buffer (Omniscript Tm), dNTP Mix (5 mM), Oligo dT (10 µM), RNase-Inhibitor, Omniscript RT und RNase-freiem Wasser.

Das Reaktionsgemisch (20 µl) wurde dann für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

4.2.4.3. Polymerasekettenreaktion

Die cDNA-Fragmente dienten als Matrize für eine PCR-Reaktion, um mit Hilfigenspezifischer Primer die Expression der zu untersuchenden Gene in den Proben nachzuweisen.

Der PCR-Ansatz wurde nach dem folgenden Protokoll angesetzt:

5 µl cDNA Template

1 µl upstream und 1 µl downstream Primer (10 µM)

5,5 µl H₂O

12,5 µl Taq Master Mix.

Der Master Mix setzte sich wie folgt zusammen: Omniscript; 1,25 U HotStarTaq DNA Polymerase, 1 x PCR Puffer (OmniscriptTM enthält unverdünnt 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP).

Die spezifischen Primer (Tab. 2) wurden bei ihrer optimalen Annealing-Temperatur für die PCR in einem Thermozykler eingesetzt.

Gen	Up-stream Primer	Down-stream Primer	Länge d. PCR-Produktes
GAPDH	5'-CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA-3'	5'-TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC-3'	600
β-actin	5'-TGA AGT CTG GAC GTG GAC ATC-3'	5'-ACT CGT CAT ACT CCT GCT TTG-3'	254
Koll I (A2)	5'-AGA CCC AAG GAC TAT GAA GT-3'	5'-ACA TCA TTA GAG CCC TGT AG-3'	509
Koll- II (A1)	5'- CAT CTG GTT TGG AGA AAC CAT C-3'	5'-GCC CAG TTC AGG TCT CTT AG-3'	606
Koll-III (A1)	5'- GAT GGG GTC AAA TGA AGG TGA -3'	5'- GCA GAT GGG CTA GGA TTC AAA -3'	546
Koll X (A1)	5'- CCT CTT GTT AGT GCC AAC CAG-3'	5'- GAG CCA CTA GGA ATC CTG AG-3'	424
Aggrecan	5'- ACT TCC GCT GGT CAG ATG GA-3'	5'- TCT CGT GCC AGA TCA TCA CC-3'	111
TGF-β1	5'- CAG AAA TAC AGC AAC AAT TCC TGG-3'	5'- TTG CAG TGT GTT ATC CGT GCT GTC-3'	187
BMP -7	5'- TTT GGG GCC AAG TTT TTC TG-3'	5'- ACA GGA ACT TCC GGG TCA AT-3'	410
BMP -2	5'- GGG AAA ACA ACC CGG AGA TT-3'	5'- TTA AGG CGT TTC CGC TGT TT-3'	503
FGF -2	5'- TAC AAC TTC AAG CAG AAG AG-3'	5'- CAG CTC TTA GCA GAC ATT GG-3'	283
VEGF	5'- AAG TGG TCC CAG GCT GCA-3'	5'- ATC TCT CCT ATG TGC TGG CC-3'	296
IL-1β	5'- AAG CAG CCA TGG CAG AAG TA-3'	5'- GAA CAC CAC TTG TTG CTC CA-3'	482
TNF-α	5'- GAG TGA CAA GCC TGT AGC CCA TGT TGT AGC A-3'	5'- GCA ATG ATC CCA AAG TAG ACC TGC CCA GAC T-3'	444

Tab. 3: für die PCR-Reaktion eingesetzten Primer

Das PCR-Protokoll umfasste für die Amplifikation von GAPDH, β-actin, Kollagen I und Kollagen III jeweils 25 Zyklen, für alle anderen Gene jeweils 37 Zyklen, wobei die Housekeeping-Gene GAPDH und β-actin als Positivkontrollen dienten. Die PCR lief nach folgendem Protokoll ab:

1. Denaturierung T= 95°C 3 min
2. Denaturierung T=94°C 30 min
3. Annealing T=60°C 45 min
4. Polymerisierung T=72°C 45 min
5. Amplifikation (Zyklen) 25 bzw. 37
6. Final elongation T=72°C 10 min

4.2.4.4. Auswertung der PCR

Das Elektrophoresegel wurde wie folgt hergestellt: 1,6 g Agarose wurden mit 80 ml TBE-Puffer versetzt und kurz aufgekocht.

Nach kurzem Abkühlen wurden 7,5 µl EthBromid zur Visualisierung der DNA zugegeben. Das Gemisch wurde in eine Gelform mit einem Kamm gegossen, der ausreichend Kammern besaß. Es entstand so ein gehärtetes Gel mit 20 Probetaschen. Das Gel wurde anschließend in eine mit TBE-gefüllte Laufkammer gelegt.

Von den jeweiligen PCR-Reaktionsprodukten wurden 8 µl mit 2 µl Loading Buffer versetzt. Für die Gelelektrophorese wurden 5 bzw. 10 µl des Molekulargewichtsmarkern eingesetzt. Die Laufzeit betrug 1 Stunde bei 100 V.

Das Loading Puffer bestand aus 0,004 g Bromphenolblau, 0,5 g Glyzerol, 0,46 l TBE Puffer und 0,5 µl Ethidiumbromid.

Die extrahierte RNA Menge und somit die RNA-Ausgangskonzentration wurde bei 260 nm mit dem Spektralphotometer gemessen.

Die Bestimmung der Mengen der amplifizierten PCR-Produkte für die einzelnen Faktoren erfolgte semiquantitativ mit Hilfe des Scion Image Release-Programmes.

Die Ergebnisse der Densitometrie waren nicht abhängig von der ausgewählten Fläche, welche die auszumessende Bande beinhaltete. Exemplarisch wurde dies mit 2 verschieden großen Flächen getestet. Die Korrelation (nach Spearman) zwischen den Ergebnissen mit den 2 verschieden großen Flächen war mit $p < 0.05$ und $\rho = 0,895$ signifikant.

Die Qualitätskontrolle der RNA erfolgte anhand der beiden Houskeeping Gene GAPDH und β -actin. Es wurden in der anschließenden statistischen Auswertung die Gele bzw. entsprechenden Bursaprobe ausgeschlossen, die nur eine sehr geringe Menge von amplifizierter β -actin mRNA aufwiesen ($< 0,2$ Units).

4.2.5. Auswertung der konventionellen Röntgenbilder

Die präoperativ erstellten Röntgenbilder der betroffenen Schulter wurden bezüglich eventuell vorhandener Kalzifizierungen analysiert und wie folgt definiert:

keine Verkalkung	= 0
geringe Verkalkung	= 1
mäßige Verkalkung	= 2
starke Verkalkung	= 3.

Eine CT als Goldstandard, um neben konventionellen Röntgenaufnahmen Verkalkungen im Bereich der RM darzustellen, stand für unsere Untersuchungen leider nicht zur Verfügung. Die MRT hat ihre Bedeutung in der exakten Diagnostik der RM-Rupturen, spielt jedoch eine untergeordnete Rolle in der Diagnostik von Verkalkungen (Rupp S, 2003).

4.2.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mittels SPSS 14.0 durchgeführt.

Für die Parameter der einzelnen Gruppen (Gruppe 1 – acromionnah, Gruppe 2 – zentral, Gruppe 3 – acromionfern, Gruppe 4 – Vergleichsgruppe gesunde Synovialmembran) wurden zunächst die Mittelwerte und Standardfehler ermittelt, sowie ein Kolmogorov-Smirnov Test bezgl. der Normalverteilung durchgeführt.

Die abhängigen (gepaarten) Stichproben wurden mittels Wilcoxon-Test analysiert

Gruppe 1	–	Gruppe 2
Gruppe 1	–	Gruppe 3
Gruppe 2	–	Gruppe 3.

Für unabhängige Stichproben wurde der U-Test nach Mann-Whitney verwendet

Gruppe 1 bis 3 – Gruppe 4

Ein Unterschied mit einem $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen und die entsprechenden Signifikanzen wurden im Diagramm markiert.

5. Ergebnisse

5.1. Klinische Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 31 Patienten (21 Männer und 10 Frauen) im Alter von 38 – 74 Jahren mit periartikulären Erkrankungen des Schultergelenkes untersucht (siehe auch Tab. 3, S.38). Verwertbare Angaben zur Beschwerdedauer lagen bei 14 der untersuchten 31 Patienten vor. In diesen Fällen betrug die Beschwerdesymptomatik durchschnittlich 16,5 Monate (1,25-120 Monate; Standardfehler 8,09). Über rechtsseitige Schulterbeschwerden klagten 18 Patienten, bei 13 Patienten war die linke Schulter betroffen, was auf eine mögliche Dominanz des rechten Armes hindeutet (Benson RT, 2009; Sørensen AK, 2007).

Summe	Geschlecht	betroffene Seite	Periartikuläres Krankheitsbild					makroskopisch beobachtete Bursitis
31	♂ / ♀	re / li	RM-Ruptur (26)		Tendinitis calcarea	Impingement	ventrale Instabilität	21/21
			komplett	partiell				
	21/10	18/13	21	5	6	8	1	

Tab. 4a: Zusammenfassung der Krankheitsbilder

Gezeigt sind die Geschlechterverteilung, die Lokalisation sowie die Häufigkeiten der beschriebenen periartikulären Schultererkrankungen und das Auftreten einer Bursitis

RM-Ruptur (26)								
betroffener Muskel				Ruptur-Kombination (10)			Ursache	
SSP	IFS	SSC	TM	SSP-IFS-SSC	SSP-IFS	SSP-SSC	Trauma	Idiopathisch
26	6	5	0	1	5	4	10	16

Tab. 4b: Zusammenfassung der betroffenen Muskeln und Ursachen

Aufzählung der allein oder kombiniert betroffenen Muskeln der RM bei Pat. mit RM-Rupturen

Alter (Jahre)	<50	50-59	60-69	>70
RM-Ruptur	3	10	12	1

Tab. 5: Altersverteilung bei RM-Rupturen

Bei 26 der untersuchten 31 Patienten wurde eine Rotatorenmanschettenruptur (RM-Ruptur) diagnostiziert.

Die Altersverteilung der Patienten mit RM-Ruptur zeigte eine hohe Prävalenz in den Altersgruppen 50-59 (10/26; 38,46%) bzw. 60-69 Jahren (12/26; 45,13%; Tabelle 5). Nur 3

Patienten mit einer RM-Ruptur (11%) waren jünger als 50 Jahre und ein Patient war älter als 70 Jahre (3,8%).

Eine komplette RM-Ruptur (21 von 26 Rupturen) trat deutlich häufiger auf als eine partielle Ruptur (5 von 26; Tab. 4a).

Der M. supraspinatus (SSP) war in allen 26 Rupturfällen betroffen (davon 21 komplett). In 6 von 26 Fällen war zusätzlich zum SSP auch der M. infraspinatus (IFS; davon 50% komplett) betroffen, in 5 von 26 Fällen auch der M. subscapularis (SSC; davon 20% komplett; Tab. 4b). In einem Fall waren gleichzeitig 3 Muskeln betroffen, d. h. der SSP, der IFS und der SSC, in 5 Fällen die Kombination aus SSP/IFS und in 4 Fällen die Kombination SSP/SSC (Tab. 4b). Eine Ruptur des M. teres minor (TM) trat nicht auf.

An ein ursächliches Trauma konnten sich nur 10 der 26 Patienten mit einer RM-Ruptur erinnern (davon 8 komplett), bei den restlichen 16 Patienten war die Ursache der Ruptur nicht bekannt.

Eine Tendinitis calcarea wurde bei insgesamt 6 der 31 untersuchten Patienten diagnostiziert, davon bei 5 Patienten als solitäres Krankheitsbild und einmal in Verbindung mit einer kompletten RM-Ruptur (Tab. 4a).

Ein knöchernes Impingement wurde bei 8 der 31 Patienten festgestellt. Diese 8 Patienten hatten alle eine RM-Ruptur (davon 7 komplett).

Ein Patient der 31 untersuchten Personen litt unter einer chronischen ventralen Instabilität in Verbindung mit einer partiellen RM-Ruptur.

Von den 21 Patienten, bei denen im OP-Bericht auf den Entzündungsstatus eingegangen wurde, wiesen 20 Patienten (95,2%) eine starke Bursitis auf und 1 Patient (4,8%) eine mäßige Bursitis; 16 von 21 Patienten mit einem Entzündungsbefund wiesen eine RM-Ruptur auf (incl. 11 komplette RM-Rupturen). Allerdings lagen die CRP-Werte im Blut bei 11/12 untersuchten Patienten im Normalbereich unter 5 mg/dl (selbst bei den 9/11 Patienten mit einer makroskopisch deutlich entzündeten Bursa subacromialis) und nur in 1/12 Patienten wurde ein minimal erhöhter CrP-Wert von 6,5 mg/dl gemessen, die insgesamt niedrigen CRP-Werte sind wahrscheinlich eine Folge der lokalen Begrenzung der Bursitis.

Die verfügbaren präoperativen Röntgenbilder (27/31 Patienten) wurden unter dem Aspekt sichtbarer Kalzifizierungen im Bereich der RM betrachtet (Abb. 13). Es wurde in 13 Fällen keine, in 8 Fällen eine geringe, 2 Fällen eine mäßige und in 4 Fällen eine starke Verkalkung beobachtet (Tabelle 6). Mit Ausnahme von einem Patienten wiesen alle Patienten mit einer Tendinitis calcarea, von denen präoperative Röntgenbilder vorlagen (4/5), einen starken

Verkalkungsgrad auf. In ca. 66% dieser Patienten (3/5) war der SSP eindeutig von den typischen Kalkablagerungen betroffen.

In der Tabelle 7 werden die Verhältnisse von RM-Rupturen in Bezug auf den Verkalkungsgrad gezeigt. Bei insgesamt 13 Rupturen wurden keine Verkalkungen erkannt, bei 7 bzw. 2 geringe bzw. mäßige Verkalkungen. Starke Verkalkungen traten bei Patienten mit einer RM-Ruptur nicht auf.

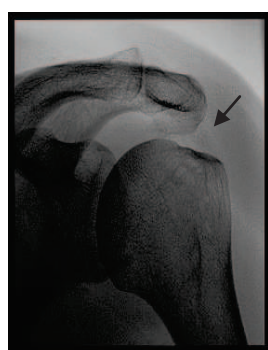
Verkalkungsgrad	0 keine	1 geringe	2 mäßige	3 starke
Patientenzahl	13	8	2	4

Tab. 6: erhobene Verkalkungsgrade

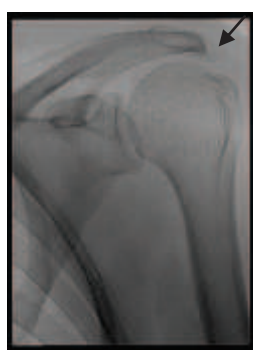
Die Verkalkungsgrade wurden anhand sichtbarer Kalzifizierungen in den konventionellen Röntgenaufnahmen im Bereich der RM erhoben

RM-Ruptur	Verkalkungsgrad			
	0 keine	1 geringe	2 mäßige	3 starke
partielle RM-Ruptur	4	1	0	0
komplette RM-Ruptur	9	6	2	0

Tab. 7: Frequenz Verkalkungsgrade bei RM-Rupturen



Grad 1



Grad 2



Grad 3

Abb. 13: Verkalkungsgrade röntgenologisch (ap Aufnahme)

Definierte Verkalkungsgrade, die die Kalzifizierungen im Bereich der RM beschreiben

5. 2. Histologische Ergebnisse

Die histologische Beurteilung der normalen Bursa trochanterica bzw. der Bursa subacromialis von Patienten mit periartikulären Schultererkrankungen erfolgte anhand der mit Hämatoxylin/Eosin gefärbten Paraffinschnitte.

Die histologische Beschreibung der veränderten Bursa subacromiales erfolgte getrennt für die Bereiche acromionnah, zentral und acromionfern (Abb. 14 und Abb. 12 in Kapitel 4).

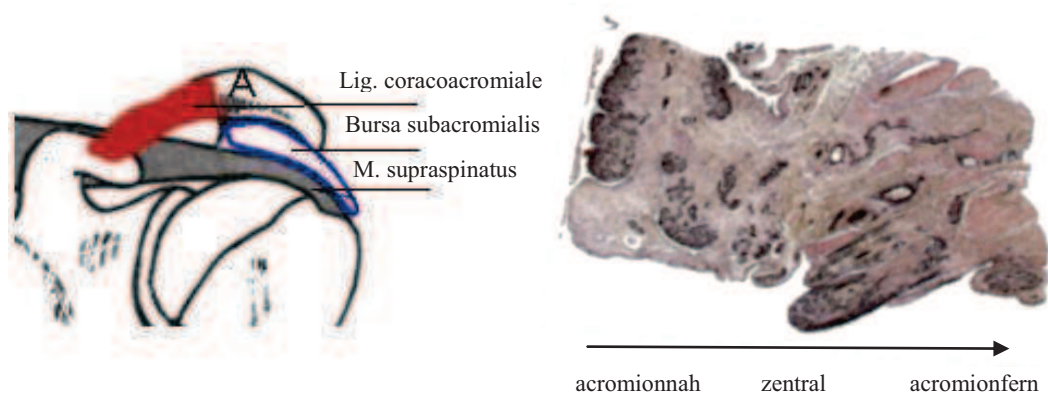


Abb. 14: Lage der Bursa subacromialis und ein HE-Schnitt der Bursa subacromialis
A – Acromion

Für die histologische Beschreibung im Vergleich zu der normalen Bursa trochanterica wurden die definierten Kriterien (Tab. 8; s. Kapitel 4 Materialien und Methoden 4.2.3 Auswertung der histologischen Schnitte) verwendet.

Für die 3 Abschnitte der Bursa subacromialis wurden die erhobenen Kriteriengrade miteinander verglichen und statistisch bewertet.

	acromionnah	zentral	acromionfern	Bursa gesamt
Kapselverdickung (0/1)	1	0	0	0,4
Bindegewebsverdichtung (0-3)	2,08 (0,95)	1,53 (0,64)	2,67 (0,82)	1,94
Gefäßvermehrung (0-3)	1,80 (0,63)	2,53 (0,52) +	0,5 (0,76)	1,82
Drüsenvermehrung (0-3)	1,9 (0,74)	2,64 (0,5) +	0,14 (0,38)	1,84
Fettvakuolen (0-3)	1,6 (0,97) +	2,79 (0,43) +	0,38 (0,74)	1,81
Auftreten v. sehnen- ähnl. Strukturen (0/1)	0	0	1 #	0,22

Tab. 8: Quantifizierung der definierten histologischen Kriterien in den einzelnen Bereichen der Bursa subacromialis

Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen sowie signifikante Unterschiede
+ $p \leq 0,05$ vs. acromionfern ; # $p \leq 0,05$ vs. acromionnah

In der normalen Bursa trochanterica waren geordnete, zumeist parallele Bindegewebsfasern in der Matrix mit dazwischen liegenden Gefäßstrukturen und Drüsengängen erkennbar (Abb. 15). Die normale Bursa trochanterica zeigte keine pathologischen Veränderungen von Kapsel, Bindegewebe bzw. Gefäß- oder Drüsenstrukturen und kein Auftreten von Fettvakuolen oder Sehnenstrukturen.

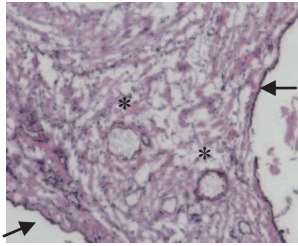


Abb. 15: Normale Bursa trochanterica.

Charakteristische Struktur mit parallelen Bindegewebsfasern, einzelne Drüsengänge (*) und einer nicht verdickten Kapsel (←)

In der pathologisch veränderten Bursa subacromialis war die Kapsel lediglich im acromionnahen Anteil verdickt (Abb. 16; Tabelle 8).

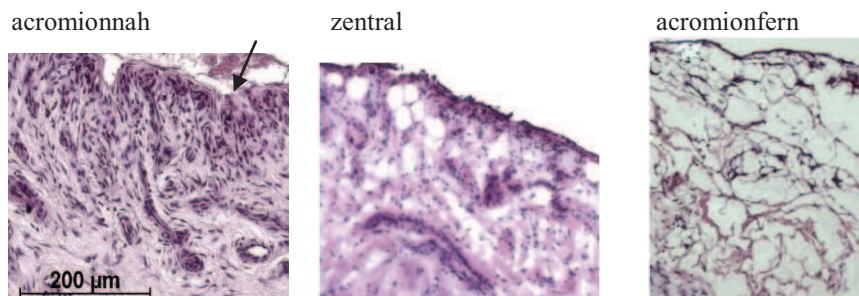


Abb. 16: Kapsel-Bereich

degenerativ/entzündlich veränderte Bursa subacromialis; ausschließliche Kapselverdickung im acromionnahen Bereich

Die Struktur des Bindegewebes war im acromionnahen und acromionfernen Bereich mäßig bzw. stark verdichtet (mittlerer Grad 2,08 bzw. 2,67; Abb. 17; Tabelle 8) im zentralen Bereich lediglich mäßig verdichtet (mittlerer Grad 1,53 Abb. 17; Tabelle 8).

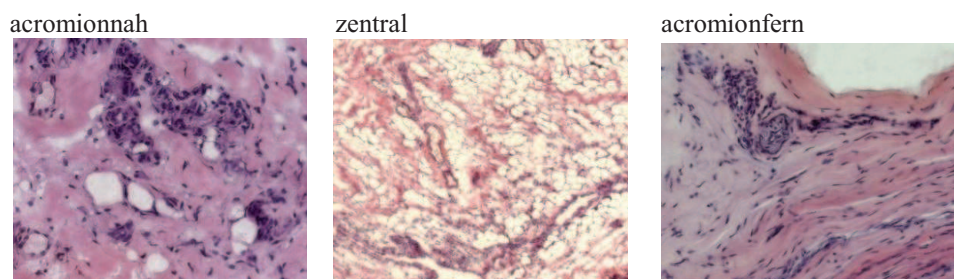


Abb. 17 Bindegewebsstruktur der einzelnen Bursaabschnitte

degenerativ/entzündlich veränderte Bursa subacromialis mit betonter Verdichtung der Bindegewebsstruktur im acromionnahen und – fernen Bereich

Ein vermehrtes Auftreten von Gefäßstrukturen war dagegen ausschließlich im acromionnahen (mittlerer Grad 1,8) und zentralen Bereich der veränderten Bursa subacromialis (mittlerer Grad 2,53; Abb. 18; Tabelle 8) erkennbar. Die Gefäßvermehrung im zentralen Abschnitt war signifikant stärker als im acromionfernen Abschnitt ($p=0.017$; Tab. 8).

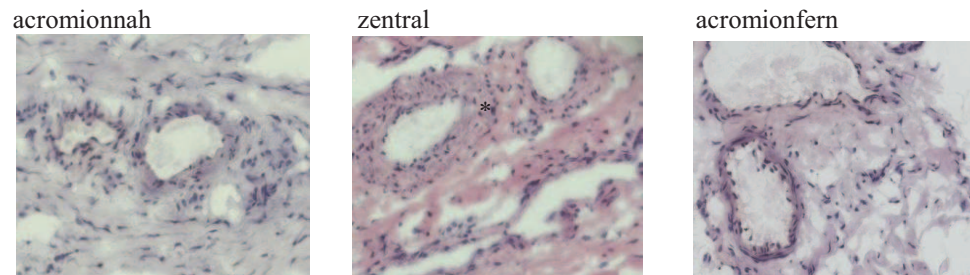


Abb. 18: vermehrtes Auftreten von Gefäßstrukturen

degenerativ/entzündlich veränderte Bursa subacromialis mit Gefäßvermehrung im acromionnahen und zentralen Bereich

Auch ein vermehrtes Auftreten von Drüsengängen war insbesondere im acromionnahen (meist azinär; Grad 1,9) und im zentralen Bereich zu finden (meist tubulär; Grad 2,64; Abb. 19; Tabelle 8), mit einem signifikant stärkerem Grad im zentralen Bereich als im acromionfernen Bereich ($p=0.023$).

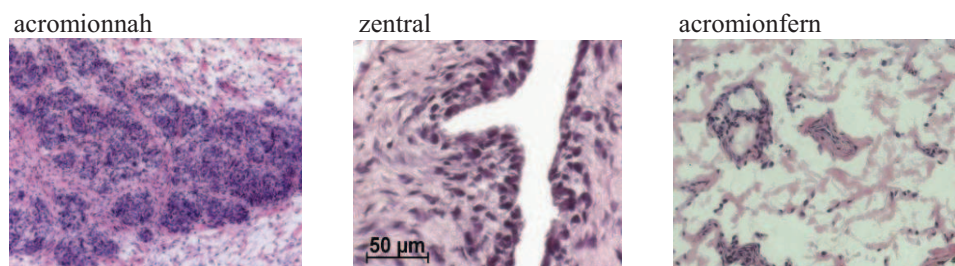


Abb. 19: Drüsenstrukturen acromionnah und zentral

degenerativ/entzündlich veränderte Bursa subacromialis mit vermehrtem Auftreten von Drüsengängen acromionnah und zentral

Fettvakuolen traten ebenfalls stark im zentralen Bereich (Grad 2,79) und mäßig im acromionnahen Bereich auf (Grad 1,6; Abb. 20; Tabelle 8). In beiden Bereichen war der Grad von Fettvakuolen allerdings stärker als im acromionfernen Bereich ($p=0.023$; $p=0.008$).

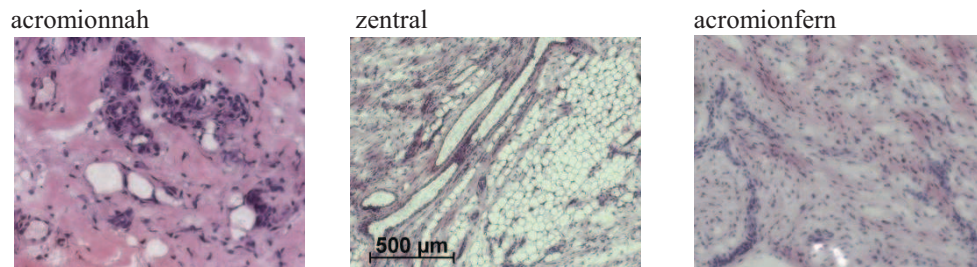


Abb. 20: Auftreten von Fettvakuolen

entzündlich veränderte Bursa subacromialis mit vermehrtem Auftreten von Fettvakuolen, insbes. Im zentralen Bereich und im geringeren Grade acromionnah

Fischzugartige sehnenähnliche Strukturen waren ausschließlich im acromionfernen Bereich der veränderten Bursa subacromialis erkennbar (mit $p=0,046$; $p=0,025$ stärker ausgeprägt als im acromionnahen bzw. zentralen Bereich; Abb. 21; Tabelle 8).

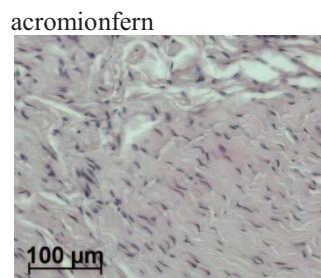


Abb. 21: sehnenähnliche Strukturen acromionfern

degenerativ/entzündlich veränderte Bursa subacromialis mit Auftreten von sehnenähnlichen Strukturen ausschließlich acromionfern

5.3. Ergebnisse der PCR

Um nachweisen zu können, dass die Bursa subacromialis nicht nur ein Speicherplatz bzw. eine Wirkungsstätte verschiedener Wachstums- und Entzündungsfaktoren ist, sondern der Syntheseort, wurde die Vergleichsgruppe (VG) der gesunden Synovialmembran bzw. die resezierten pathologisch veränderten Bursen mittels PCR bezüglich der Expression spezifischer mRNA für die verschiedenen Zielmoleküle untersucht.

5.3.1. Ergebnisse der Vergleichsgruppe

Vier gesunde Synovialmembranen dienten als normale Vergleichsgruppe für die mRNA-Expression in dem Vergleich zu pathologisch veränderten Bursae subacromiales (Abb. 22). Während mRNA für Kollagen II, Aggrecan, b-FGF und IL-1 β nicht oder nur in sehr geringer

Menge detektiert wurde, war die mRNA für alle anderen Moleküle (insbesondere für Kollagen I und III) deutlich nachweisbar.

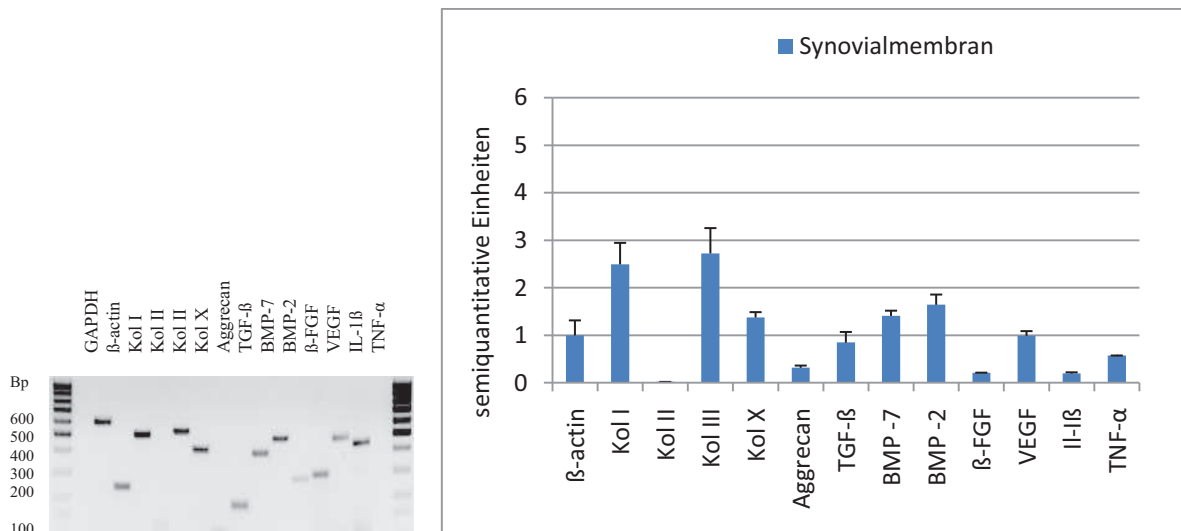


Abb. 22: PCR-Analyse einer gesunden Synovialmembran mit Mittelwerten und Standardfehlern der mRNA-Expressionen für die einzelnen Gene (β -actin normalisiert)

5.3.2. Ergebnisse der Bursa subacromialis Proben

Die einzelnen Bereiche der Bursa subacromialis wurden bezüglich der mRNA-Expression der verschiedenen Zielmoleküle miteinander verglichen. Für jeden Teilbereich der Bursa subacromialis zeigte sich ein spezifisches Expressionsmuster der untersuchten Faktoren (Abb. 23).

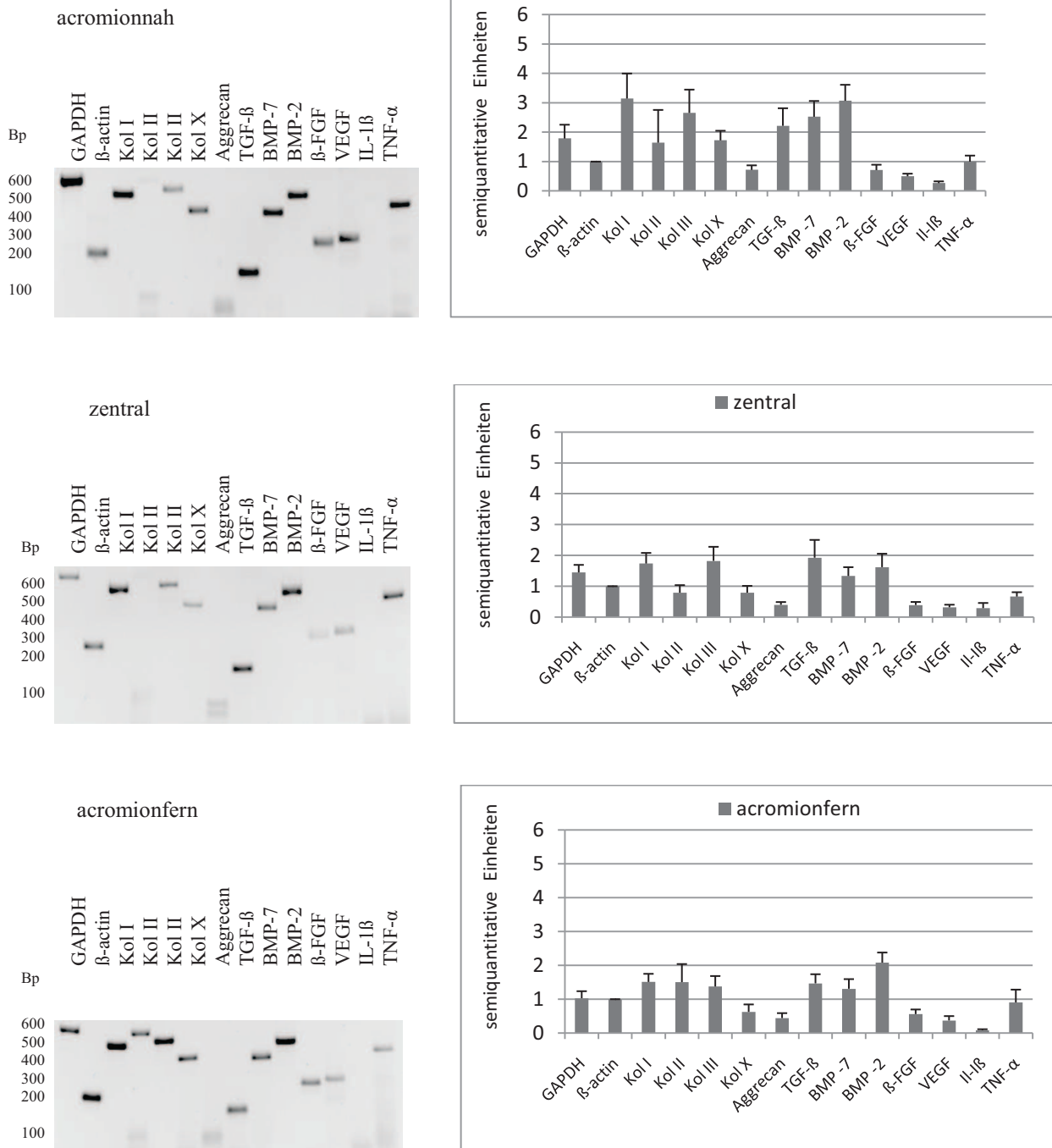


Abb. 23: PCR-Analyse in der gesamten Bursa subacromialis mit Mittelwerten und Standardfehlern der mRNA-Expressionen für einzelnen Gene (β -actin normalisiert)

Als Zeichen des Gewebeumbaus wurde zunächst die mRNA-Expression für die Kollagene I, II, III und X bzw. für Aggrecan untersucht (Abb. 24 a+b).

In der gesamten Bursa subacromialis war die mRNA-Expression für die Kollagene I, X und für Aggrecan numerisch höher als in der gesunden Vergleichsgruppe (VG). Die mRNA-

Expression für Kollagen II war gegenüber der VG signifikant erhöht (Abb. 24 a). Kein Unterschied zeigte sich in der Expression von Kollagen III.

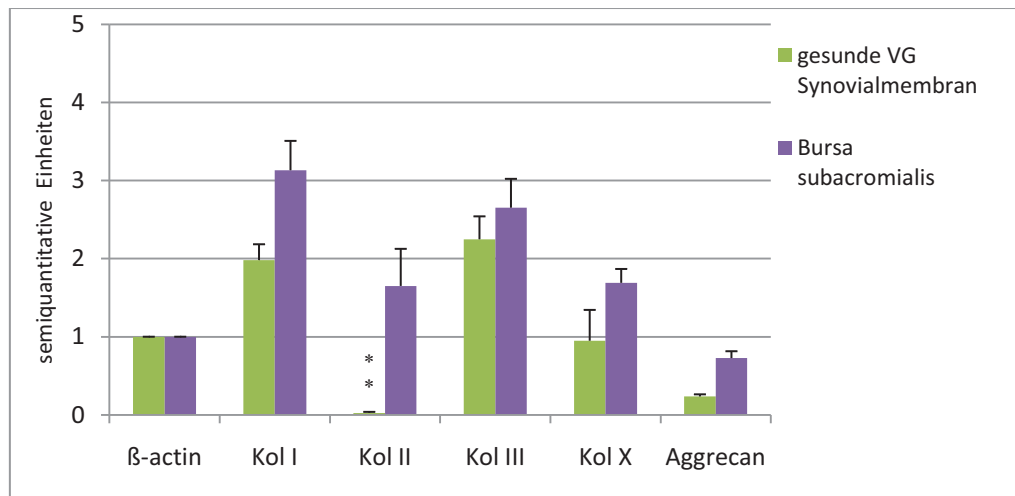


Abb. 24a: PCR-Analyse der Kollagene und von Aggrecan in der gesamten Bursa subacromialis im Vergleich zur gesunden Synovialmembran (Mittelwerte und Standardfehler); ** $p \leq 0,01$ vs. Synovialmembran

Die Ergebnisse der mRNA-Expression für die Kollagene und Aggrecan für die einzelnen Bursaabschnitte sind in Abb. 24 b dargestellt. Die höchste mRNA-Expression für Kollagen I, das Hauptkollagen des Bindegewebes, wurde im acromionnahen Bereich der veränderten Bursa subacromialis beobachtet. Die Expression von Kollagen I im acromionnahen Bereich war gegenüber der normalen Vergleichsgruppe numerisch und gegenüber dem zentralen Bereich signifikant erhöht ($p=0,012$).

Die mRNA-Expression für Kollagen II, einen chondroiden Differenzierungsmarker, war in der gesamten Bursa subacromialis gegenüber der VG signifikant erhöht ($p=0,008$). Die Expressionsstärke in den einzelnen Abschnitten der Bursa war ebenfalls jeweils signifikant höher als in der VG (acromionnaher Bereich $p=0,009$; zentraler Bereich $p=0,002$; acromionferner Bereich $p=0,010$), allerdings ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Teilbereichen.

Für Kollagen III ergaben sich weder im Vergleich zur VG, noch beim Vergleich der einzelnen Regionen signifikante Unterschiede.

Kollagen X, ein Marker für Hypertrophie bzw. osteogene Differenzierung, wurde wie Kollagen I im acromionnahen Bereich der veränderten Bursa subacromialis am stärksten exprimiert. Die Expression von Kollagen X war gegenüber der Vergleichsgruppe numerisch und gegenüber den anderen Bereichen der Bursa subacromialis jeweils signifikant erhöht (zentral $p=0,017$; acromionfern $p=0,015$).

Aggrecan, ein weiterer chondrogener Differenzierungsmarker, war ebenfalls im acromionnahen Bereich der veränderten Bursa subacromialis am höchsten exprimiert (numerisch erhöht gegenüber der VG; signifikant erhöht gegenüber dem zentralen Bereich; $p=0,025$).

Auffallend war eine numerische bzw. signifikante Überexpression der Kollagene I und X sowie Aggrecan im acromionnahen Bereich und zwar sowohl gegenüber der VG als auch gegenüber dem zentralen und/oder acromionfernen Teil. Kollagen II war dagegen in allen Teilbereichen der Bursa gegenüber der VG überexprimiert.

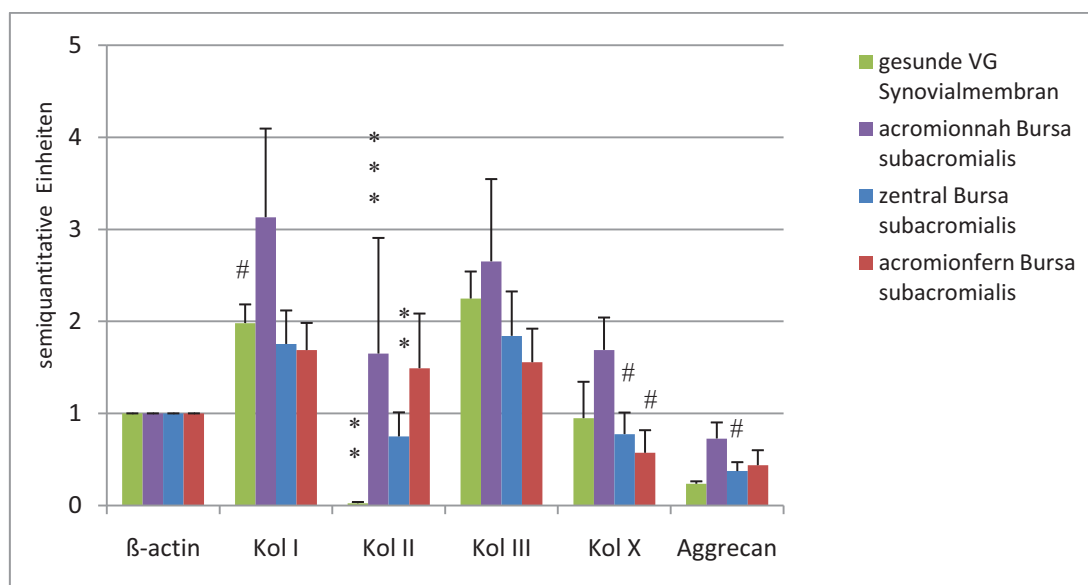


Abb. 24b: PCR-Analyse der Kollagene und von Aggrecan in den einzelnen Bereichen der Bursa und im Vergleich zur gesunden Synovialmembran (Mittelwerte und Standardfehler)

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,005$ vs. gesunde Synovialmembran
$p \leq 0,05$ vs. acromionnahes Stück

Weiterhin wurde die Genexpression für verschiedene Wachstumsfaktoren der TGF- β -Großfamilie, d. h. TGF- β selbst sowie BMP-2 und -7 und die Wachstumsfaktoren bFGF-2 und VEGF untersucht (Abb. 25 a+b).

In der gesamten Bursa subacromialis war die mRNA-Expression für die Wachstumsfaktoren TGF- β , BMP-2, BMP-7 und bFGF numerisch höher als in der gesunden Vergleichsgruppe (VG) (Abb. 25 a). Im Gegensatz dazu war die mRNA-Expression von VEGF in der gesunden

VG numerisch höher. Allerdings traten zwischen der VG und den pathologisch veränderten Bursa subacromiales keine signifikanten Unterschiede auf.

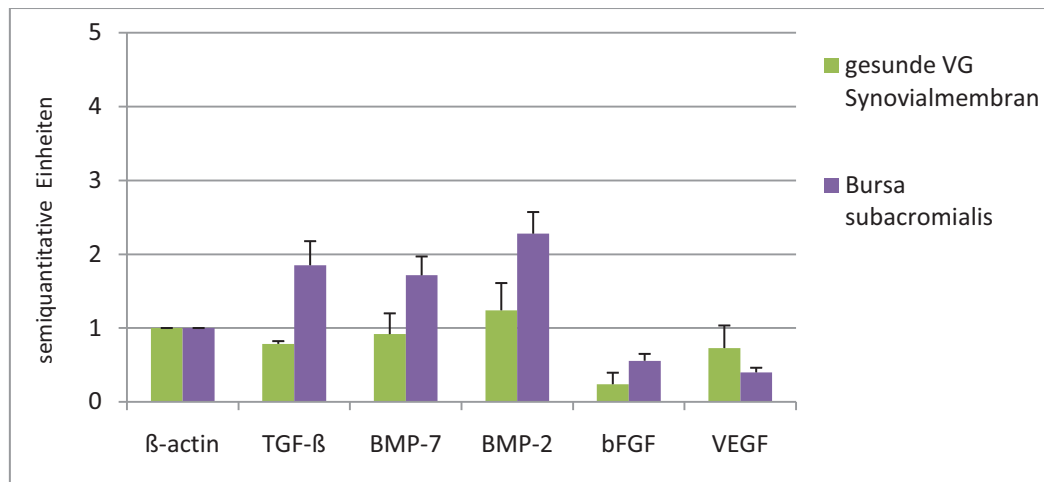


Abb. 25a: PCR-Analyse der Wachstumsfaktoren in der gesamten Bursa subacromialis im Vergleich zur gesunden Synovialmembran (Mittelwerte und Standardfehler)

TGF-β war im acromionnahen Bereich der Bursa subacromialis gegenüber der Vergleichsgruppe numerisch und gegenüber dem zentralen Bereich signifikant erhöht ($p=0,050$). Nach acromionfern hin war eine weitere numerische Abnahme der Expression erkennbar (Abb. 25 b).

Auch BMP-7 wurde acromionnah am stärksten exprimiert. Wie bei TGF-β war gegenüber der Vergleichsgruppe numerisch und gegenüber dem zentralen Abschnitt signifikant erhöht ($p=0,025$).

Für die BMP-2-Expression ergaben sich weder im Vergleich zur gesunden Vergleichsgruppe noch zwischen den einzelnen Abschnitten der Bursa subacromialis signifikante Unterschiede in der Expression. Allerdings war die mRNA-Expression im acromionnahen und acromionfernen Abschnitt numerisch höher als zentral.

Die mRNA-Expression von b-FGF war im acromionnahen Bereich Bursa subacromialis gegenüber der Vergleichsgruppe numerisch und gegenüber dem zentralen Bereich signifikant erhöht ($p=0,036$).

Für VEGF ergaben sich weder im Vergleich zur VG, noch beim Vergleich der einzelnen Regionen signifikante Unterschiede. Die mRNA-Expression war in allen Bereichen der Bursa subacromialis numerisch geringer als in der gesunden Vergleichsgruppe.

Im acromionnahen Abschnitt der veränderten Bursa subacromialis waren erneut die mRNA-Expressionen der untersuchten Wachstumsfaktoren, mit Ausnahme von VEGF, signifikant (TGF- β ; BMP-7, b-FGF) bzw. numerisch (BMP-2) überexprimiert.

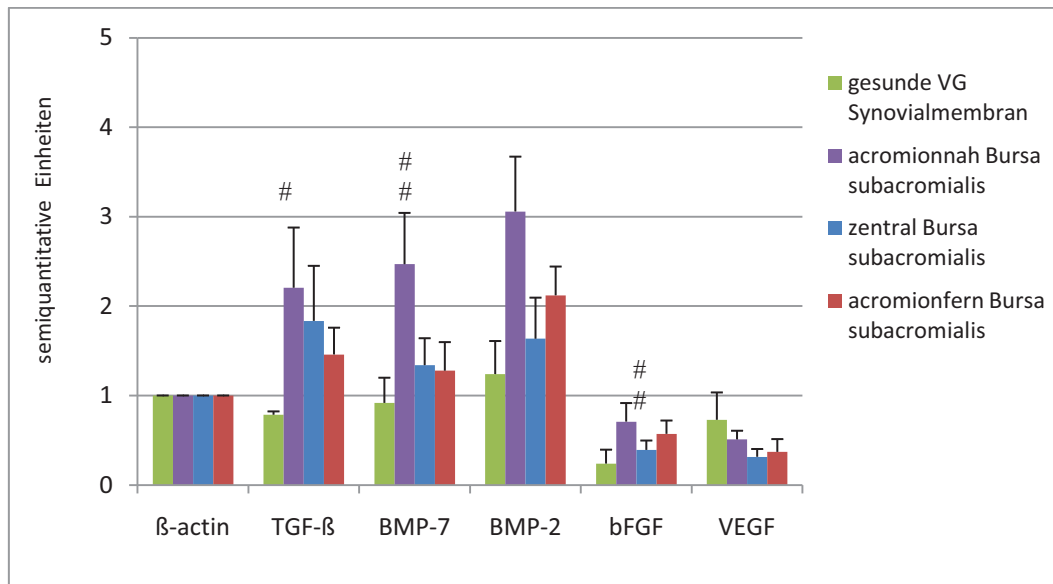


Abb. 25b: PCR-Analyse der Wachstumsfaktoren in den einzelnen Bereichen der Bursa und im Vergleich zur gesunden Synovialmembran (Mittelwerte und Standardfehler)
 # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ vs. acromionnah

Für die Zytokine IL-1 β und TNF- α ergaben sich weder im Vergleich der gesamten Bursa subacromialis zur VG, noch beim Vergleich der einzelnen Regionen untereinander signifikante Unterschiede (Abb. 26 a+b).

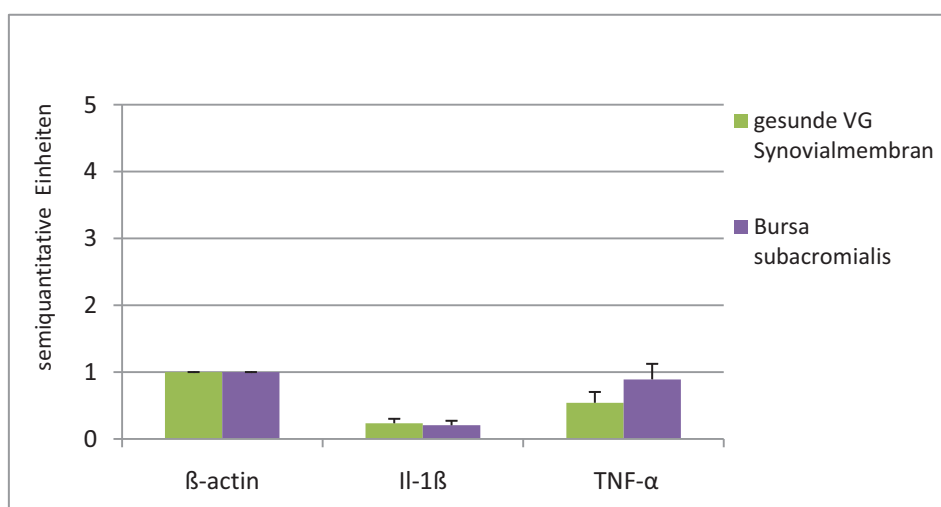


Abb. 26a: PCR-Analyse der Entzündungsfaktoren in der gesamten Bursa subacromialis im Vergleich zur gesunden Synovialmembran (Mittelwerte und Standardfehler)

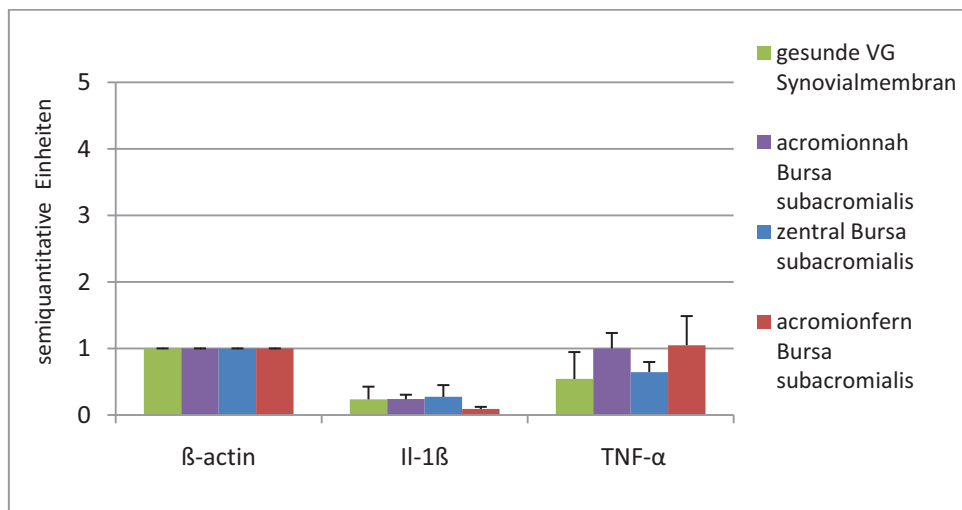


Abb. 26b: PCR-Analyse der Entzündungsfaktoren in den einzelnen Bereichen der Bursa und im Vergleich zur gesunden Synovialmembran (Mittelwerte und Standardfehler)

5.4. Immunhistochemische und enzymhistochemische Ergebnisse

Mit Hilfe der Immunhistochemie wurde das Vorkommen und die Lokalisation der Kollagene (I, II, X) bzw. der Wachstumsfaktoren BMP-2 und -7 in der Bursa subacromialis untersucht (Tab. 9).

Aktivität	Acromionnah	Zentral	Acromionfern
Kollagen I	2	2	2
Kollagen II	1	1-2	2
Kollagen X	2	0	2
Alkal. Phosphatase	3	2	0
BMP -2	2	3	0
BMP -7	2	3	0

Tab. 9: Lokalisation der Proteine sowie der Nachweis der Aktivität der Alkalischen Phosphatase in den einzelnen Bereichen der Bursa subacromialis

5.4.1. Die Kollagene

Die untersuchten Kollagene wiesen innerhalb der Bursa subacromialis (Tab. 9) bezüglich der relativen Stärke der Färbung oder bezüglich ihrer Lokalisation ein spezifisches Verteilungsmuster auf.

Kollagen I war in annähernd gleicher Färbeintensität in den 3 verschiedenen Bereichen der Bursa subacromialis nachweisbar (Tab. 9). Im acromionnahen Bereich war das interstitielle Bindegewebe, aber nicht der Kapselbereich positiv gefärbt. Im zentralen Abschnitt war das interstitielle Bindegewebe zwischen den drüsigen Elementen für Kollagen I positiv, im acromionfernen Abschnitt das Gewebe zwischen sehnenähnlichen Strukturen sowie der Übergangsbereich zur Sehne des M. supraspinatus (SSP) bzw. die Sehnenfasern der SSP (Abb. 27 a+b).

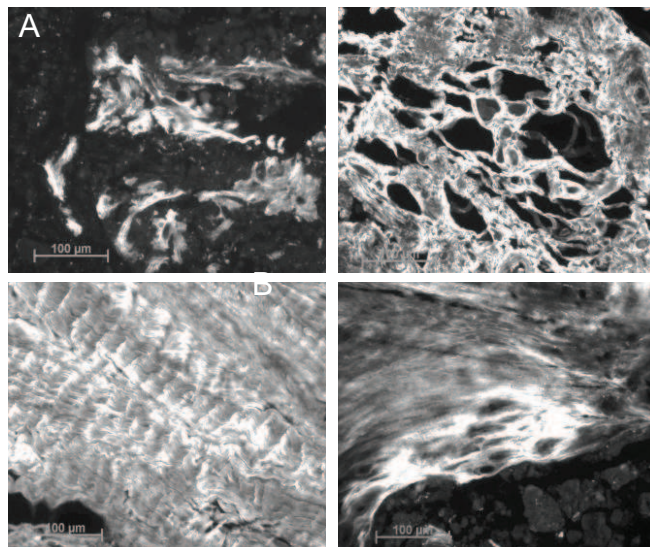


Abb. 27a: Darstellung von Kollagen I-Protein mittels Immunhistochemie im zentralen Abschnitt

Proteinnachweis im interstitiellen Bindegewebe

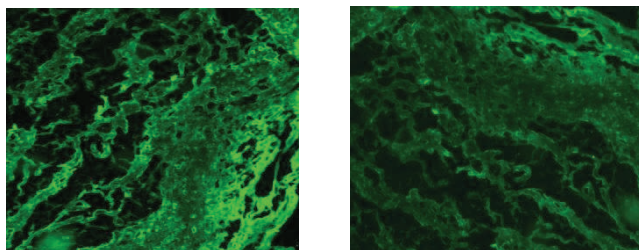


Abb. 27b: Darstellung von Kollagen I-Protein mittels Immunhistochemie im acromionfernen Bereich

Proteinnachweis zwischen sehnenähnlichen Zellen

Die Färbeintensität für Kollagen II war in den 3 Bereichen der Bursa subacromialis unterschiedlich. Während das Kollagen II zentral und acromionfern nachweisbar war, konnte es acromionnah nur in geringer Intensität detektiert werden (Tab.9). Eine positive Reaktion zeigte im zentralen Abschnitt das Bindegewebe (Begrenzung der Drüsengänge) und insbesondere im acromionfernen Teil der Bursa subacromialis sehnenähnliche Strukturen (Tab 9; Abb. 28).

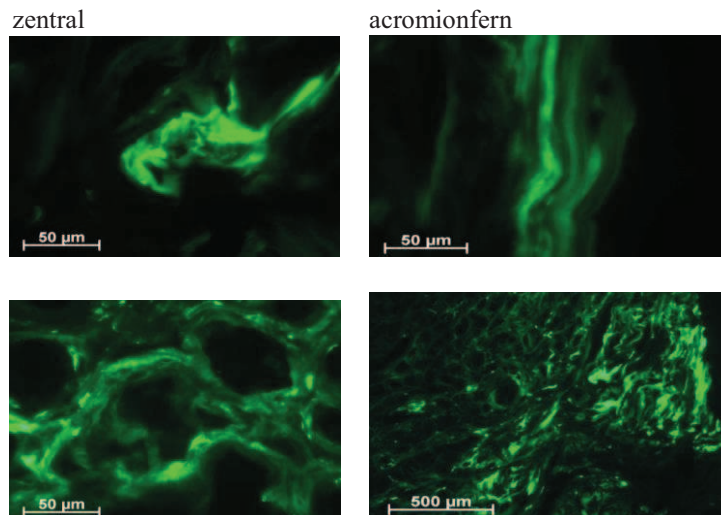


Abb. 28: Darstellung Kollagen II-Protein im zentralen und acromionfernen Abschnitt
 Proteinnachweis im Bindegewebe des zentralen Abschnittes und in sehnenähnlichen Strukturen acromionfern

Kollagen X zeigte im acromionnahen und acromionfernen Abschnitt eine positive Färbereaktion, jedoch nicht im zentralen Bereich der Bursa subacromialis (Tab. 9).

Im acromionnahen Abschnitt war der verdickte Kapselbereich positiv und im acromionfernen Abschnitt sehnenähnliche Strukturen im Übergangsbereich zur Sehne des SSP (Abb. 29).

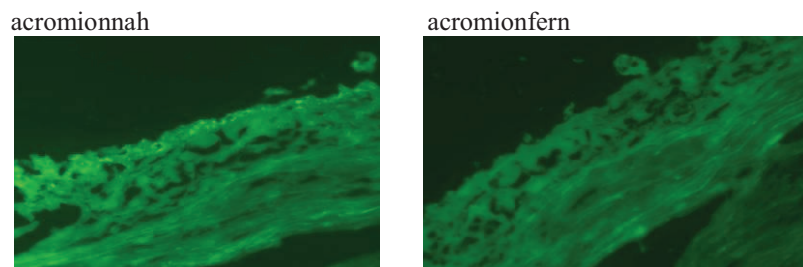


Abb. 29: Darstellung von Kollagen X-Protein acromionnah und acromionfern
 Proteinnachweis im Kapselbereich des acromionnahen Abschnittes und zwischen sehnenähnlichen Strukturen acromionfern

5.4.2. BMP-2 und BMP-7

Die untersuchten BMPs wiesen, ähnlich wie die Kollagene, ein spezifisches Verteilungsmuster innerhalb der Bursa subacromialis auf (Tab. 9).

BMP-2 war mit hoher Färbeintensität acromionnah und zentral, jedoch nicht acromionfern nachweisbar.

Im acromionnahen Abschnitt zeigten sich positive Reaktionen für BMP -2 im Kapselbereich bzw. im subkapsulären Bindegewebe, und im zentralen Abschnitt in den Zellen der Drüsengänge, in den Wänden von Venulen und Arteriolen (Abb. 30) und im lockeren interstitiellen Bindegewebe.

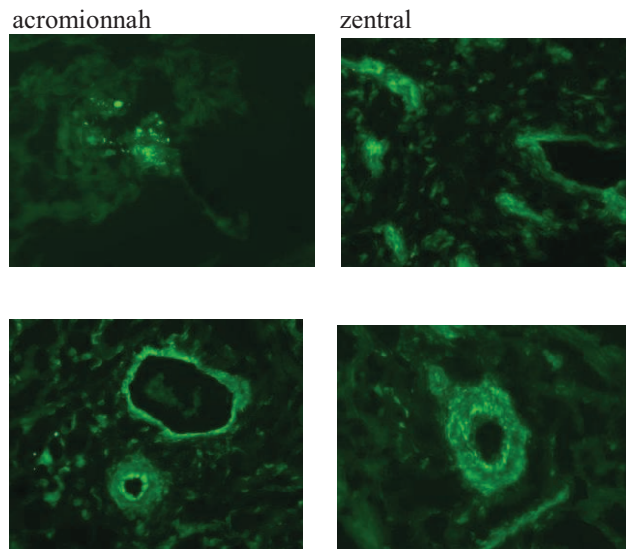


Abb. 30: Darstellung von BMP-2 Protein acromionnah und zentral
Proteinachweis in Bindegewebe sowie in Wänden von Drüsengängen und Gefäßen

Die Färbeintensität für BMP-7 war im zentralen Abschnitt hoch, mäßig im acromionnahen und gering im acromionfernen Abschnitt.

Acromionnah war BMP-7 im interstitiellen Bindegewebe nachweisbar. Eine positive Reaktion zeigte sich im zentralen Abschnitt v.a. im interstitiellen Bindegewebe und in den Gefäßwänden und in den Wänden der Drüsengänge. Eine schwache Reaktion konnte im dichten interstitiellen Bindegewebe des acromionfernen Abschnittes nachgewiesen werden (Abb.31).

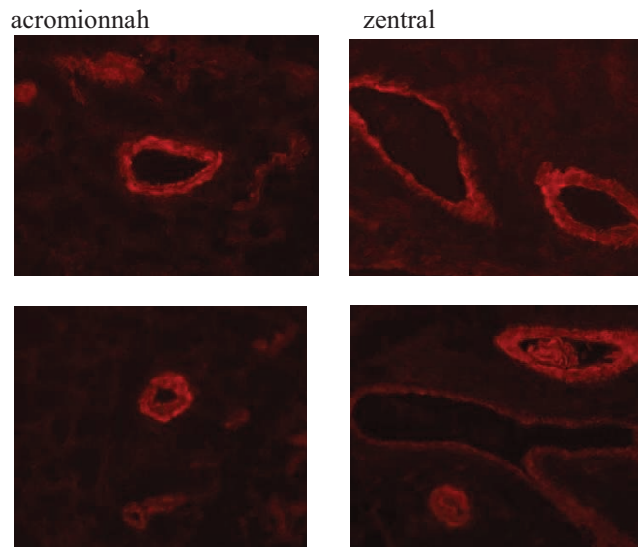


Abb. 31: Darstellung von BMP-7 Protein acromionnah und zentral
 Proteinnachweis im Bindegewebe sowie in den Drüsengangs- und Gefäßwänden

5.4.3. Nachweis der alkalischen Phosphatase

In der Bursa subacromialis war acromionnah eine hohe Aktivität von Alkalischer Phosphatase nachweisbar, insbesondere im Kapselbereich (Abb. 32). Im zentralen Bereich war die Aktivität der AP mäßig (Kapsel, Randbereiche der Gefäß- und Drüsengänge). Im acromionfernen, sehnennahen Abschnitt war dagegen keine Aktivität nachweisbar (Tab. 9).

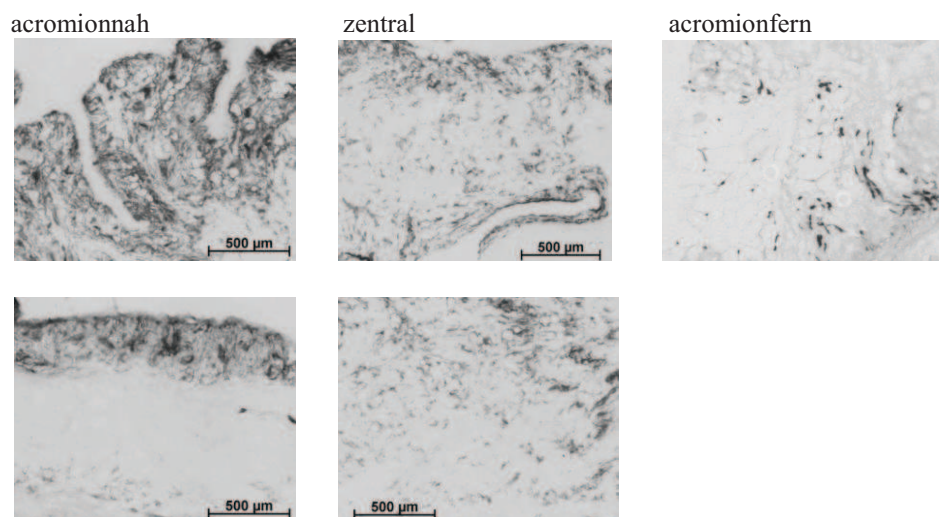


Abb. 32: Nachweis der Aktivität von Alkalischer Phosphatase in den einzelnen Bereichen der Bursa subacromialis

6. Diskussion

6.1. Begründung für die detaillierte Untersuchung verschiedener Regionen der pathologisch veränderten Bursa subacromialis

Mit insgesamt 6,6 – 25% sind Schmerzen im Bereich der Schulter die dritthäufigsten Beschwerden im gesamten Bewegungsapparat der Patienten. Als Ursache der Beschwerden kommen neben arthritischen Veränderungen auch periartikuläre Erkrankungen in Frage, z. B. Verletzungen der RM, das Impingementsyndrom, die Tendinitis calcarea und die Frozen Shoulder (Shin KM, 2011). Neben der individuellen Belastung für den einzelnen Patienten ist dabei auch von einer hohen sozioökonomischen Belastung auszugehen.

Bei periartikulären Erkrankungen der Schulter ist fast immer ist auch die Bursa subacromialis entzündlich verändert (Santavirta S, 1992; Machida A, 2004). In manchen Fällen tritt dabei auch eine chondroide Metaplasie in der Bursa oder der Rotatorenmanschette auf, wobei die ursächliche Verbindung der Entzündung mit der Metaplasie noch unklar bzw. umstritten ist (Tillander B, 2001; Löhr, JF 2007; Benson, RT 2009). Auch ist momentan unklar, ob die Entzündung der Bursa subacromialis eher als Ursache oder als sekundäre Folge der periartikulären Schultererkrankungen anzusehen ist (Tillander B, 2001; Zhu JY, 2004; Shindle MK, 2011).

Außerdem wird berichtet, dass verschiedene Regionen der RM bzw. des M. supraspinatus (SSP) (gelenkseitig bzw. bursaseitig; Seite 10) unterschiedliche mechanische Eigenschaften zeigen (Lee SB, 2000) bzw. eine unterschiedliche Vaskularisierung und Dichte an freien Nervenenden aufweisen (Fukuda H, 1989; Gotoh M, 1998). Der bursaseitigen Region der RM wird dabei eine höhere Gefäßdichte und Gewebesteifigkeit zugeschrieben als der gelenkseitigen Region. (Lee SB, 2000; Löhr JF, 2007). Am gelenkseitigen Anteil der RM werden vermehrte faserknorpelige Einsprossungen beobachtet, als Anpassung an die herrschenden Druckverhältnisse. Letztlich scheinen RM-Rupturen, die durch extrinsischen Stress wie Trauma oder Impingement verursacht werden, primär eher den bursaseitigen Teil der RM zu betreffen (wie im Falle einer partiellen Ruptur) und sich dann eventuell auf den gelenkseitigen Anteil der RM auszudehnen und dann zu einer kompletten Ruptur zu führen (Lee SB, 2000; Fukuda H, 1989). Im Gegensatz dazu werden bei partiellen RM-Rupturen des gelenkseitigen Anteils eher degenerative Faktoren als Ursachen diskutiert (Schneeberger AG, 1998; Löhr JF, 2007; Shin KM, 2011). Aufgrund der genannten Befunde wurde schon frühzeitig ein möglicher Beitrag der Bursitis in der Bursa subacromialis zu der Entstehung von RM-Rupturen diskutiert.

Um einerseits einen solchen direkten Beitrag von Veränderungen in der Bursa subacromialis zur Entstehung der RM-Ruptur zu untersuchen und insbesondere den relativen Beitrag von rupturnahen (acromionnah) und rupturfernen Anteilen der Bursa (acromionfern; in der Nähe des Sehnenansatzes) zu differenzieren, gliederten wir in der vorliegenden Arbeit die Bursa subacromialis nach der anatomischen Lagebeziehung zu Acromion und der Sehne des SSP in die drei Abschnitte acromionnahes, zentrales und acromionfernes bzw. sehnennahes Stück. Die Regionen wurden getrennt untersucht.

In der vorliegenden Untersuchung konnten dabei sowohl histologisch als auch auf mRNA- und Proteinebene regionale Unterschiede in der Bursa subacromialis gezeigt werden. Dabei wurde der Nachweis erbracht, dass die Expression bzw. Synthese der Moleküle BMP -2 und -7 sowie die Aktivität der Alkalischen Phosphatase einen starken Gradienten vom acromionnahen zum acromionfernen Bereich der Bursa subacromialis aufwies, d. h. in allen Fällen war eine signifikant oder numerisch stärkere Expression im acromionnahen Bereich zu beobachten. Diese Befunde deuten auf eine chondroide/osteogene Metaplasie in diesem Bereich der Bursa subacromialis hin, mit einer möglichen Bedeutung als „extrinsischer“ Faktor für die Pathogenese der RM-Ruptur. Es ist denkbar, dass diese Veränderungen im weiteren Verlauf zu einer vergleichbaren chondroiden Metaplasie in der Sehne des M. supraspinatus (SSP) führen, als ein weiterer pathogenetischer Ansatz für periartikuläre Krankheitsbilder der Schulter (Rupp S, 2003; Benson RT, 2008; Shin KM, 2011).

6.2. Klinische Ergebnisse

Bei unseren Patienten wurden RM-Rupturen als periartikuläre Schultererkrankungen am häufigsten diagnostiziert (26 der 31 untersuchten Fälle (83,9%)). Die Altersverteilung der Patienten mit RM-Ruptur entsprach Literaturbefunden mit einer hohen Prävalenz in den Altersgruppen 50-59 (10/26; 38,46%) bzw. 60-69 Jahren (12/26; 45,13%). Dabei trat meist eine komplette RM-Ruptur (21 von 26 Fällen; 81%) und seltener eine partielle Ruptur auf (5 von 26 Fällen; 19%). In Literaturangaben schwankt der Anteil zwischen 18-36% für komplette RM-Rupturen bzw. 13%-20,5% für partielle RM-Ruptur (Grifka H, 2007; Sørensen AKB, 2007; Ozaki J, 1988; Yamaguchi K, 2006). Grund für die Abweichungen sind wahrscheinlich unterschiedliche Studienkonzepte. So untersuchten wir ein Patientengut mit therapieresistenten Schulterbeschwerden, während andere Studien Patienten mit RM-Rupturen und Patienten mit einer vorderen Schulterinstabilität oder mit gesunden Schultern verglichen; außerdem waren die Untersuchungszeiträume der Studien unterschiedlich lang.

In Übereinstimmung mit der Literatur (Oliva F, 2011; Gumpert, N 2012; Gohlke F, 2002) waren in unserer Studie weitere diagnostizierte periartikuläre Krankheitsbilder der Schulter in abnehmender Häufigkeit das Impingementsyndrom mit 25,8% (8 von 31 Pat.), die Tendinitis calcarea mit 19,4% (6 von 31 Patienten) und einmal die ventrale Instabilität mit 3,2%.

Außerdem war bei RM-Rupturen in guter Übereinstimmung mit bisher publizierten Literaturen eine charakteristische Verteilung der betroffenen Muskeln erkennbar (Beckmann J, 2011). Bei Vorliegen einer RM-Ruptur war in unserer Studie der M. supraspinatus (SSP) in allen Fällen rupturiert (26 von 26 Rupturen), in der Fachliteratur wird eine Ruptur der SSP bei RM-Rupturen in 95% beschrieben. Der M. infraspinatus (IFS) war in unserer Studie bei 21,1% (6/26) der RM-Rupturen betroffen und der M. subscapularis (SSC) bei 19,2% (5/26). Diese Häufigkeit entspricht ungefähr der charakteristischen Beteiligung der beiden Muskeln (IFS 40% und SSC 10%) bei RM-Rupturen in der Literatur. Ebenfalls in Übereinstimmung mit der Literatur rupturierte der M. teres minor (TM) bei keinem unserer Patienten.

In unserem Patientengut traten bei 19,2% aller RM-Rupturen (5/26) eine gemeinsame Ruptur des SSP und IFS und bei 15,4% aller RM-Rupturen (4/26) eine gemeinsame Ruptur des SSP und SSC auf. In der Literatur sind bei ca. 33,2 - 76% der kombinierten RM-Rupturen der SSP und IFS beteiligt und bei 27% der SSP und SSC, d.h. die Prozentsätze sind in der vorliegenden Arbeit etwas niedriger als in den Literaturangaben, zeigen jedoch ebenfalls eine Dominanz der kombinierten Rupturen von SSP und IFS.

Große Rupturen aller 3 Muskeln (SSP, SSC und IFS) haben eine Inzidenz von 4-15% (Beckmann J, 2011). Bei einem unserer Patienten lag einmal eine solche Ruptur vor, dies entsprach 3,84%. Als Erklärung für die Rupturverteilungen sind neben unterschiedlichen Krafteinwirkungen und Verletzungsabläufen der anatomische Verlauf und insbesondere die Ansatzstellen der betroffenen Sehnen zu nennen. Der SSP und IFS besitzen z.B. eine gemeinsame Insertionsselle ihrer Ansatzsehnen ventral am Tuberculum major des Oberarmkopfes. Diese beiden Muskeln dienen der Außenrotation und Abduktionsbewegung, den beiden kraft- und bewegungsaufwändigsten Bewegungen im Schultergelenk. Neben den Zugkräften sind diese Muskeln aufgrund der bei Bewegung erforderlichen Rotation im Oberarmkopf auch Scherkräften ausgesetzt. Sowohl Zug- als auch Scherkräfte können die Kollagenfasern schwächen und zu sekundären Einrissen an den Sehnen der RM führen. Weniger kraftaufwändig sind die Innenrotation durch den SSC und die Adduktion des Oberarmes durch den TM (Boehm TD, 2007; Löhr JF, 2007), was eventuell zur geringeren Beteiligung dieser Muskeln bei RM-Rupturen beiträgt.

Neben intrinsischen Faktoren (z.B. degenerative Veränderungen) werden verschiedene extrinsische Faktoren für RM-Rupturen diskutiert (Grifka J, 2007; Longo UG, 2012; Shin KM, 2011). Dazu gehören insbesondere Traumata und das Impingementsyndrom.

In unserer Kohorte gaben 10 von 26 Patienten (38,5%) an, sich an ein Trauma in der Anamnese zu erinnern, mit einem Abstand vom Trauma zur diagnostizierten RM-Ruptur zwischen 4 Monaten und einigen Jahren. Literaturbefunde zeigen ebenfalls, dass 40-72% der Patienten mit einer RM-Ruptur von einem Schultertrauma im Zeitraum zwischen ca. 70 und 300 Tagen vor der RM-Operation berichten (Sørensen A, 2007). Auch andere Autoren benannten auf der Basis von Querschnittsstudien das Trauma neben dem Alter und dem betroffenen dominanten Arm als einen signifikanten Risikofaktor für eine RM-Ruptur (Yamamoto A, 2010).

In unserer Kohorte hatten 8 der 26 Patienten mit einer RM-Ruptur (30,8%) ein Impingementsyndrom. Einige Autoren gehen davon aus, dass 95% der RM-Rupturen durch ein Impingement verursacht werden (Löhr JF, 2007, Hall LC et al., 2010). Gemäß der Pathogenese des Impingementsyndroms kommt es im fortgeschrittenen Stadium III zu Degenerationen und Minderperfusionsen v.a. im ansatznahen Bereich der Sehnen der RM. Folglich werden die Sehnen für Scher- und Zugkräfte vulnerabler und es kann dann auch bei leichten Traumata zu einer RM-Ruptur kommen (Löhr JF, 2007; Mayerhöfer ME, 2004). Bei 5 Patienten mit einer RM-Ruptur lagen tatsächlich sowohl ein Impingement als auch ein Trauma vor.

In unserer Studie trat bei circa einem Drittel der Patienten (29%) die RM-Ruptur ohne erkennbare extrinsische Ursache auf. In diesen Fällen der RM-Ruptur können dafür beispielsweise intrinsische degenerative Faktoren mit altersabhängigen Veränderungen in den Sehnen der RM angesehen werden. Als degenerative Veränderungen werden in der Literatur histologisch neben einer vermehrten mukoiden Degeneration der Sehnenbündel, das Auftreten von Fettvakuolen sowie Einlagerungen von Hydroxyapatitmikrokristallen zwischen den Sehnenfaserbündeln beschrieben (Shin KM, 2011).

Als weiterer möglicher intrinsischer Faktor für RM-Rupturen wird die chondroide Metaplasie diskutiert, d. h. die Transformation von Tendozyten in Chondrozyten (Tillander B, 2001). Diese chondroide Metaplasie tritt bevorzugt im Bereich der „kritischen Ansatzzone“ des SSP auf, in dem sich auch vermehrt die Sehnenrisse der RM finden. Die Ansatzzone stellt einen hypovaskulären Bereich dar, in dem leichter hypoxische Zustände und nachfolgend eine Transformation von Tendozyten in Chondrozyten auftreten. Die Chondrozyten bilden dann vermehrt Proteoglykane, so dass in diesem Bereich Faserknorpel mit Verkalkungstendenz

entsteht (Thomopoulos S, 2001; Rupp S, 2003), der auch als Vorstadium der Tendinitis calcarea betrachtet wird.

Eine Assoziation zwischen dem Auftreten einer RM-Ruptur und der Tendinitis calcarea ergab sich in unserer Studie nicht. Nur einmal wurde im Rahmen einer diagnostizierten Tendinitis calcarea eine RM-Ruptur festgestellt. Dies entspricht klinischen Erfahrungen und Literaturangaben, wonach RM-Rupturen üblicherweise nicht mit einer Tendinitis calcarea einhergehen (Koprävalenz 1%) (Rupp S, 2003).

In unserer Studie war bei einer Tendinitis calcarea in mindestens 60% (3 von 5 Patienten) der SSP von den Kalkablagerungen betroffen war. In Literaturangaben tritt bei der Tendinitis calcarea die Kalkablagerung ebenfalls am häufigsten im SSP auf (80%), gefolgt von dem IFS und SSC (15% bzw. 5%) (Rupp S, 2003).

In den ausgewerteten konventionellen Röntgenbildern fanden sich im betroffenen Schulterbereich bei 14 der 27 Röntgenaufnahmen röntgendichte Verkalkungen (Grad 1 – 3). Ausgeprägte Kalkherde (Grad 3) waren ausschließlich in Patienten mit einer Tendinitis calcarea sichtbar (4 von 5). In den übrigen 10 Fällen (Grad 1 und 2) waren die Verkalkungen als Zeichen einer chondroiden/osteogenen Metaplasie zu werten. Die Tatsache, dass bei diesen 10 Patienten auch RM-Rupturen auftraten (davon 8 komplette RM-Rupturen), kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass Verkalkungen in der kritischen Ansatzzone des SSP zu einer RM-Ruptur beitragen können.

In 13 von 27 Aufnahmen waren keine röntgenologischen Verkalkungen erkennbar, obwohl histologisch bzw. mittels PCR oder Immunhistologie eine chondroide Metaplasie in der Bursa belegt wurde (s. Punkt 5.2. und 5.3.). Ein Grund dafür ist möglicherweise, dass knöcherne bzw. knorpelige Matrixgewebe keine ausreichende Röntgendichte für konventionelle Röntgenaufnahmen erreichen (Rupp, S 2003).

Das Patientengut in unserer Studie war damit bezüglich der Parameter Prävalenz der verschiedenen periartikulären Erkrankungen (incl. komplette/partielle RM-Rupturen), der Altersverteilung der Patienten mit RM-Ruptur, der Beteiligung verschiedener Muskeln an der RM-Ruptur sowie der zugrundeliegenden extrinsischen (Impingement oder Trauma) oder intrinsischen ätiopathogenetischen Faktoren mit dem Patientengut in bereits publizierten Studien gut vergleichbar und daher repräsentativ.

Die Ergebnisse, die mit einem Teil der Patientenproben erhoben wurden (nur die Patienten mit einer RM-Ruptur), wurden bereits publiziert (Neuwirth, J et al., 2006).

6.3. Pathologische Veränderungen in der Bursa subacromialis

Die Bursa subacromialis erfüllt als Schleimbeutel eine wichtige Funktion als mechanischer Puffer zwischen Schulterdach (Acromion) und Rotatorenmanschette (RM). Daher sind die beiden Blätter der Bursa von pathologischen Veränderungen im subacromialen Raum (z. B. Verengungen beim Impingement) unmittelbar betroffen und reagieren häufig mit einer Entzündung. So wurde bei Patienten mit Impingement-Syndrom in der Bursa subacromialis eine verstärkte Expression der mRNA für verschiedene Zytokine und Proliferationsfaktoren (Il-1 β , TNF- α , VEGF, b-FGF, Substanz P) sowie Kollagene (insbesondere Kollagen I und III) nachgewiesen und daher eine wichtige pathogenetische Rolle der Bursa subacromialis postuliert (Lo IK et al., 2005; Santavirta S et al., 2004; Sakar K, 2004; Blaine TA, 2005; Voloshin I, 2005; Ko JY, 2008; Gotoh M, 2001).

Allerdings ist der genaue Beitrag solcher Veränderungen zu periartikulären Erkrankungen im Allgemeinen bzw. zur Genese von RM-Rupturen oder Tendinitis calcarea im Speziellen, bisher noch nicht geklärt. Auch ist weitgehend unklar, ob die Entzündung der Bursa subacromialis nicht eher eine sekundäre Folge als die Ursache der periartikulären Schultererkrankungen ist (Tillander B, 2001; Zhu JY, 2004; Shindle MK, 2011).

In experimentellen Modellen konnte aber interessanterweise gezeigt werden, dass es bei Induktion einer Entzündung in der Bursa subacromialis zu sekundären Veränderungen in den RM-Sehnen kommt, mit erhöhter Ablagerung von Fibronectin, einer vermehrten Infiltration von Makrophagen, Veränderungen der Kollagenstrukturen und einer chondroiden Metaplasie des SSP (Tillander B, 2001).

In unserer Studie wurde die Bursa subacromialis tatsächlich in 21 von 22 (95,2%) bewerteten Fällen makroskopisch als stark entzündet und einmal als mäßig entzündet beschrieben. Dies entspricht Literaturbefunden, die zeigen, dass die Bursa bei periartikulären Erkrankungen der Schulter fast immer entzündlich verändert ist (Rahme H, 1993; Stallenberg B, 2006; Zhu JY, 2004; Yang S, 2009; Tillander B, 2001; Uhthoff HK, 2004).

Vor der aktuellen Studie gab es in der Literatur nur wenige detaillierte histologische Betrachtungen der Bursa subacromialis im gesunden und pathologischen Zustand (Tillander B, 2000; Santavirta S, 2004; Sakar K, 2004; Shindle MK, 2011). Sakar zeigte in seiner Arbeit einen Zellzahlanstieg in der Bursawand, eine Proliferation von Gefäßen sowie Fettvakuolen in Bursen von Patienten mit einer RM-Ruptur bzw. einer Tendinitis calcarea im Vergleich zu der Bursa eines Patienten mit einer Arthrose des AC-Gelenkes (Sakar K, 2004). Als histologische und degenerative Veränderungen wurden bisher primär das Vorhandensein bzw. Nicht-

Vorhandensein von Fibrose bzw. ödematöse Veränderungen in der Bursa oder in den betroffenen Sehnen der rupturierten RM-Muskeln beschrieben. In den Sehnen der RM wurden außerdem ausgedünnte und degenerierte Kollagenfasern sowie Gefäßproliferation, Fettinfiltration und chondroide Metaplasien mit lokaler Kalzifizierung nachgewiesen (Rahme H, 1993; Longo UG, 2007; Benson RT, 2009). Die detaillierte Analyse regionaler Unterschiede in der Bursa subacromialis auf histologischer Ebene sowie durch PCR und immunhistochemische Methoden ist in der vorliegenden Arbeit erstmals durchgeführt worden.

Dabei wurde in den zentralen Abschnitten der entzündeten Bursae subacromiales histologisch ein verstärktes Auftreten von Gefäß- und Drüsengängen sowie Fettvakuolen beobachtet, während das Bindegewebe in den acromionnahen und acromionfernen Abschnitten eher eine dichte Matrixstruktur aufwies. Die acromionnahen Bereiche der Bursa zeigten außerdem eine erhöhte Aktivität von Alkalischer Phosphatase sowie Proteinablagerungen von BMP -2 und -7 sowie Kollagen X und damit Zeichen einer möglichen Kalzifizierung. Im Gegensatz dazu wurden in dem Vergleichspräparat der gesunden Bursa trochanterica keine pathologischen Veränderungen detektiert.

Die von uns beobachteten Alterationen in den einzelnen Abschnitten der entzündeten Bursae könnten einerseits degenerative Veränderungen darstellen, könnten aber auch die Folge einer Schleimbeutelentzündung sein. Bei Patienten mit RM-Rupturen, Impingement oder Tendinitis calcarea wurden in der Bursa subacromialis tatsächlich vermehrte Infiltrationen von mononukleären Zellen, Leukozyten und Zytokinen nachgewiesen (Sakar K, 2004; Zhu J, 2004; Shindle MK, 2011; Benson RT, 2009; Uhthoff HK, 2000).

Die regionalen Unterschiede der pathologischen Veränderungen in der Bursa subacromialis und insbesondere die prominenten Alterationen im acromionnahen Bereich wurden durch die PCR-Untersuchungen bekräftigt. Im acromionnahen Bereich wurden nämlich Kollagen II, Kollagen III und BMP -2 numerisch sowie Kollagen I, Kollagen X, Aggrecan, TGF- β , und BMP-7 signifikant stärker exprimiert als in den anderen Bereichen. Außerdem zeigte sich in diesem Bereich immunhistochemisch eine hohe Intensität für Kollagen I und X sowie von BMP-2 und BMP-7. Letztlich zeigte der acromionnahe Bereich eine starke Aktivität der Alkalischen Phosphatase, v.a. im Kapselbereich. Auf der Basis dieser Befunde, insbesondere der erhöhten mRNA-Expression von BMP-7 und Kollagen X (Tillander B, 2001; Benson RT, 2009), kann eine chondroide Metaplasie bzw. lokale Kalzifizierung dieser Region angenommen werden, mit einer möglichen pathogenetischen Bedeutung für die räumlich benachbarten Sehnenansätze der Rotatorenmanschette.

6.4. Chondroide Metaplasie im acromionnahen Bereich der Bursa subacromialis: Expression- und Funktion der Wachstumsfaktoren

Die erhöhte Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Kapsel- und Bindegewebsbereich des acromionnahen Anteils der Bursa subacromialis sowie die verstärkte Expression von BMP-2 und -7 können als Zeichen einer chondroiden Metaplasie bzw. Kalzifizierung interpretiert werden (s. o.).

In einigen Studien wurde bereits über das Auftreten einer chondroiden Metaplasie im Bereich der RM und Bursa subacromialis berichtet (Benson RT, 2008; Longo UG, 2007; Shin KM, 2011). Dabei wurden an der rupturierten SSP-Sehne durch die van Gieson-Färbung knorpelähnliche Veränderungen nachgewiesen. Auch das Auftreten von Mastzellen, eine Differenzierung von Fibroblasten in Chondrozyten sowie erhöhte mRNA-Expressionen von b-FGF, einem bekannten Induktor einer chondroiden Differenzierung (Weisser J et al. 2001; Li A, 2008; Perrier E, 2011), unterstützen die Annahme einer chondroiden Metaplasie. Weiterhin wurden in der Bursa subacromialis nach traumatischer RM-Ruptur (experimentelle Ruptur des SSP) eine chondroide Metaplasie sowie hohe Expressionen von BMP-2 und -7 beobachtet (Fuhrmann, R 2003).

Die Induktion einer solchen Metaplasie, aber auch der physiologischen Knochen- bzw. Knorpelbildung erfordert die Rekrutierung und/oder Proliferation von Vorläuferzellen sowie die Bildung der EZM. Dafür sind neben den BMPs zahlreiche andere Hormone und gewebsspezifische Wachstumsfaktoren notwendig (Kim HN et al., 2011).

6.4.1. b-FGF

In unseren Untersuchungen war in der gesamten entzündeten Bursa subacromialis eine gegenüber der gesunden Vergleichsgruppe numerisch erhöhte mRNA-Expression von b-FGF nachzuweisen, wiederum mit dem höchsten Signal im acromionnahen Bereich.

Sakai konnte im Rahmen von Untersuchungen bei RM-Verletzungen ebenfalls eine gegenüber normalen Kontrollen erhöhte mRNA-Expression von b-FGF sowie Ablagerungen von b-FGF Protein in endothelialen Zellen und Wänden von Blutgefäßen der Bursa subacromialis nachweisen (Sakai H, 2001), die evt. auch als Hinweise auf das Vorhandensein einer chondroiden Metaplasie gewertet werden könnten.

6.4.2. TGF- β

Wie im Falle der o.g. Moleküle wurde die TGF- β mRNA in der gesamten entzündeten Bursa subacromialis gegenüber den gesunden Vergleichsgeweben numerisch höher exprimiert, allerdings wiederum mit einem signifikant bzw. numerisch höheren Transkriptionsniveau in der acromionnahen Region im Vergleich zu den anderen Abschnitten. Ein Grund für die allgemein erhöhte Expression von TGF- β in der entzündeten Bursa im Vergleich zur normalen Bursa könnten verstärkte mechanische Stressbelastungen sein, die bei RM-Rupturen oder dem Impingement durch Einengung des subacromialen Raumes auftreten und zu einer Steigerung der TGF- β -Expression führen (Sakai H, 2001). In diesem Fall könnte die erhöhte mRNA-Expression von TGF- β über die Aktivierung der Alkalischen Phosphatase bzw. der Synthese von Kollagen II und Proteoglykan in der Knorpelmatrix ebenfalls zur chondroiden Metaplasie im acromionnahen Teil der Bursa beitragen (Tokifumi M, 2005; Perrier E, 2011). Für TGF- β wird neben einer möglichen positiven Rolle (Bedi A et al. 2012) tatsächlich auch eine negative Rolle bei der Sehneneinheilung nach Refixation der RM diskutiert, da hohe initiale Werte von TGF- β in der Bursa subacromialis mit einer stärkeren Fibrose und Narbenbildung durch aktivierte Fibroblasten und einer daraus resultierenden Abnahme der Sehnenelastizität assoziiert waren (Sakai H, 2001; Würzler-Hauri C et al. 2007). Ob eine (transiente) chondroide Metaplasie zu diesen Veränderungen beiträgt und ob die Veränderungen zu einem höheren Re-Ruptur-Risiko führen, ist allerdings momentan noch in der Diskussion (Fuhrmann et al. 2002).

Detaillierte Untersuchungen zur Expression von TGF- β in den einzelnen Sub-Regionen der entzündeten Bursa subacromialis wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals durchgeführt und die diesbezüglichen Ergebnisse deuten erneut auf eine besondere Bedeutung der acromionnahen Region bei der Entwicklung der chondroiden Metaplasie hin.

6.4.3. BMP-2 und BMP -7

Auch die mRNA für BMP-2 und -7 war in der gesamten entzündeten Bursa subacromialis gegenüber der gesunden Vergleichsgruppe numerisch höher exprimiert. Wie bereits bei der Alkalischen Phosphatase bzw. den Wachstumsfaktoren b-FGF und TGF- β beobachtet, wurde auch die BMP-2 und -7 mRNA im acromionnahen Bereich signifikant oder numerisch höher exprimiert als in den beiden anderen Abschnitten. Diese Daten wurden durch immunhistochemische Untersuchungen auch auf der Proteinebene bestätigt, d. h. eine positive

Färbung war v.a. im subkortikalen Bindegewebe des acromionnahen Abschnittes bzw. im Bindegewebe und den Wänden der Drüsen und Gefäße des zentralen Teils nachweisbar.

Es ist bekannt, dass mechanischer Streß, die BMP-2 Expression erhöht (Schmal H et al., 2012). Bezogen auf die Bursa subacromialis und die nachgewiesene erhöhte BMP-2 Expression können beispielsweise das Impingementsyndrom oder der gebogene Acromiontyp nach Bigliani als exogene Faktoren, Druck bzw. mechanischen Streß auf die Bursa ausüben. Erhöhte Expressionen von BMP-7 und/oder BMP-2 in betroffenen RM-Sehnen bei RM-Ruptur, Tendinitis calcarea oder ventraler Schulterinstabilität wurden jeweils im Vergleich zu gesunden RM-Sehnen bereits in mehreren Studien nachgewiesen (Pauly S, 2011; Chen C, 2011; Oliva F, 2011). Dabei deutet die Tatsache, dass in den meisten Studien Patienten mit starker Sehnenalteration (z. B. Tendinitis calcarea oder RM-Ruptur) eine stärkere Expression von BMP-7 und/oder BMP-2 zeigten als solche mit milderer Formen (z. B. ventrale Schulterinstabilität), auf eine pathogenetische Bedeutung dieser Moleküle bei periartikulären Erkrankungen des Schultergelenkes hin, z. B. durch die Induktion einer chondroiden Metaplasie.

Diese Annahme wird einerseits durch Beobachtungen unterstützt, die zeigten, dass BMP-2 und BMP-7 in pluripotenten mesenchymalen Vorläuferzellen die Aktivität der Alkalischen Phosphatase erhöhen und die muskuläre Differenzierung durch Inhibierung der Myogenin mRNA hemmen (Katagiri T, 1995; Cheng H, 2004); außerdem zeigten Beobachtungen an Chondrozytenkulturen, dass BMP-2 die Expression von Kollagen II und Aggrecan erhöht und damit den chondrozytären Phänotyp stabilisiert bzw. reinduziert (Sailor LZ, 1996; Zhu W, 2006).

Andererseits wird durch eine experimentelle Tierstudie zur traumatischen SSP-Ruptur und anschließenden Refixierung vermutet, dass eine ektope Expression von BMP-2 und -7 in der Bursa subacromialis zu einer fortschreitenden Ausdehnung der chondroiden Ansatzzone beiträgt (Fuhrmann R et al. 2003). Eine frühzeitige Entfernung der Bursa könnte daher die chondroide Metaplasie in den Sehnen der RM vermindern.

6.4.4. VEGF

VEGF mRNA war in unserer Studie in der entzündeten Bursa subacromialis nicht signifikant unterschiedlich zur normalen Synovialmembran exprimiert. Unterschiede zwischen den einzelnen Bursaabschnitten traten ebenfalls nicht auf. Analog zu diesen Befunden wurden bei detektierbarer VEGF-mRNA Expression keine Unterschiede zwischen der Bursa von Patienten mit kompletter bzw. partieller RM-Ruptur oder von Patienten mit ventraler

Instabilität bzw. Tendinitis calcarea beobachtet (Shindle MK, 2011; Oliva F, 2011). Yanagisawa et al. zeigten dagegen bei einer Kohorte von Patienten ausschließlich mit Impingementsyndrom positive Zusammenhänge zwischen der Frequenz von Fällen mit positiver VEGF-mRNA Expression in der Bursa und dem Auftreten von Bewegungsschmerz sowie der synovialen Proliferation in der Bursa (Yanagisawa K et. al, 2001). In der gleichen Studie war die Frequenz der Fälle mit positiver VEGF-mRNA Expression in der Bursa signifikant mit der Gefäßdichte in der Bursa assoziiert, ein Befund, der sich in der aktuellen Studie ebenfalls nicht reproduzieren ließ. Ein Grund dafür könnte eine höhere relative Bedeutung von anderen Wachstumsfaktoren (z. B. b-FGF) für die Neovaskularisation in der entzündeten Bursa subacromialis bei verschiedenen periartikulären Erkrankungen des Schultergelenkes sein (Sakai H, 2001). Insgesamt bleibt die Rolle von VEGF bei RM-Rupturen unklar. In einem Tiermodell zeigten sich erhöhte VEGF-Expressionen in der verletzten SSP, wobei nicht unklar ist, ob es sich bei der erhöhten Expression um eine Antwort auf die Verletzung oder bereits stattfindende Heilungsprozesse handelt (Bedi A, 2012).

6.5. Verteilung der Kollagene/Expression der EZM

Die untersuchten Kollagene I, II, III und X zeigten ein spezielles Expressionsmuster in der Bursa subacromialis. Es war bereits bekannt, dass die Synthese dieser Kollage durch den in unserer Studie überexprimierten Wachstumsfaktor TGF- β unterstützt wird (Perrier E, 2011). In Fibroblasten ist TGF- β z. B. ein hochpotenter Induktor der Kollagensynthese, v.a. von Kollagen I, II, III und X (Würigler-Hauri CC, 2007). Zahlreiche Studien untersuchten bereits das Verhalten der Kollagene bei RM-Rupturen und bei der Tendinitis calcarea (Eriksen H, 2002; Thomopoulos S, 2002; Yokota A, 2005; Shirachi I, 2011), die einerseits eine wichtige Rolle der Kollagene in der Sehnenheilung, andererseits aber auch eine Veränderung und Schwächung der Sehnenstrukturen beschrieben.

6.5.1. Kollagen I

Als klassischer Bindegewebs- bzw. Fibrosemarker ist Kollagen I für die mechanische Kraft der Sehnen verantwortlich (Eriksen H, 2002). Kollagen I wurde in der aktuellen Arbeit sowohl in der gesunden Synovialmembran als auch in allen Abschnitten der Bursa subacromialis exprimiert. Die mRNA-Expression war dabei im acromionnahen Abschnitt

signifikant bzw. numerisch höher als in den anderen Abschnitten. Auf der Proteinebene konnte Kollagen I ohne regionale Unterschiede in der gesamten Bursa immunhistochemisch nachgewiesen werden.

Als induzierende Faktoren für die regional unterschiedliche Kollagen I mRNA-Expression kommen die Wachstumsfaktoren TGF- β , BMP-7 und in begrenztem Maß BMP-2 in Frage; diese Wachstumsfaktoren zeigten eine ähnlich heterogene Verteilung in den verschiedenen Bursaabschnitten und sind als dosisabhängige Induktoren der Kollagen I-Expression und -Synthese in Fibroblasten (Perrier E, 2011; Würbler-Hauri CC, 2007) bzw. in Tenozyten und Fibroblasten im refixierten Bereich der RM bei Patienten mit RM-Ruptur beschrieben (Pauly S, 2011). Eine mögliche Folge der vermehrten Kollagen I Expression und Gewebeverdichtung ist die Hyperplasie der Bursa subacromialis mit einer Einengung des subacromialen Raumes.

6.5.2. Kollagen II und Aggrecan

Die mRNA Expression für Kollagen II und Aggrecan war in der gesamten entzündeten Bursa subacromialis gegenüber der gesunden Vergleichsgruppe signifikant bzw. numerisch erhöht. In Analogie dazu wurde im Rahmen eines Ratten-Tiermodells zur RM-Ruptur mit Refixierung des SSP eine höhere Expressionen von Kollagen II und Aggrecan im neuen Sehnenansatz als im unverletzten Kontrollgewebe gefunden, allerdings ohne spezifische Angaben zur Bursa subacromialis (Thomopoulos S, 2002). Die höchste regionale mRNA-Expression für die beiden knorpeltypischen Moleküle fand sich in der aktuellen Studie im acromionnahen Bereich, ein erneuter Hinweis auf eine chondroide Metaplasie mit evt. abnehmender Sehnenelastizität in diesem Bereich. Auch diese Befunde stimmen prinzipiell mit Literaturbefunden überein, in denen eine erhöhte Kollagen II mRNA-Expression in den betroffenen Sehnen der RM bei Patienten mit verschiedenen Tendinopathien beobachtet wurde (Oliva, F 2011). Als lokaler Induktor der Kollagen II Expression kommt aufgrund seiner bekannten Wirkungen und gleichartigen regionalen Verteilung in der entzündeten Bursa z. B. TGF- β in Frage (s.o.; Perrier E, 2011; Würbler-Hauri CC, 2007). Die Gründe für die unterschiedliche regionale Verteilung von Kollagen II mRNA und Protein sind momentan weitgehend unklar und könnten am ehesten in unterschiedlichen Translationsraten der RNA in Protein in den verschiedenen Abschnitten liegen.

6.5.3. Kollagen III

Die Kollagen III mRNA-Expression zeigte im Gegensatz zu den anderen Kollagenen eine vergleichbare, d. h. physiologische Verteilung in der gesunden Vergleichsgruppe und der entzündeten Bursa bzw. in den einzelnen Abschnitten der Bursa. In Übereinstimmung mit diesen Daten gilt Kollagen III als Reparaturkollagen während der Sehnenheilung, tritt aber auch unter normalen Umständen im Bindegewebe auf (Shirachi I, 2011).

Die Kollagen III Expression könnte in Fällen von kompletter RM-Ruptur für die Heilung von zentraler Bedeutung sein, wenn bei der RM-Ruptur auch die Bursa verletzt wird und ein gleichzeitiges „Remodeling“ von Sehne und Bursa erforderlich ist (Lo IK, 2005). Andererseits könnte die Expression von Prokollagen III in der Bursa subacromialis zu einer gewissen Schultersteife mit postoperativen Bewegungseinschränkungen und Reduzierung der Sehnenkraft führen und daher im Falle eines chirurgischen Eingriffes die Entfernung der Bursa als angemessen erscheinen lassen (Tomonaga, A., 2000). Die endgültige Klärung dieser Frage ist weiterführenden klinischen Studien vorbehalten.

6.5.4. Kollagen X

Wie im Falle von b-FGF, TGF- β , BMP-2, BMP-7, Kollagen II und Aggrecan war auch die Kollagen X mRNA in der gesamten entzündeten Bursa subacromialis gegenüber der gesunden Vergleichsgruppe numerisch höher exprimiert, wiederum mit einem (signifikant) höheren Transkriptionsniveau in der acromionnahen Region im Vergleich zu den anderen Abschnitten. Die Kollagen X Expression spricht für die Anwesenheit von hypertrophen Chondrozyten bzw. im Zusammenhang mit der Aktivität der Alkalischen Phosphatase für zeitgleich ablaufende Mineralisationsvorgänge (Oliva F, 2011; Chen CH, 2010). So wurde erneut die Hypothese unterstützt, dass die chondroide Metaplasie acromionnah betont ist.

Bezüglich der wahrscheinlich stattfindenden Mineralisationsvorgänge konnte in unserer Studie keine signifikante Korrelation zwischen dem erhobenen Verkalkungsgrad in den Röntgenbildern und den ermittelten Kollagen X-mRNA Werten in der Bursa subacromialis belegt werden (Rangkorrelation nach Spearman $\rho=0,208$; $p=0,319$; $n=25$). Gründe für diese fehlende Korrelation könnten in der hohen Unsicherheit bei der korrekten Gradeinteilung der Verkalkungen bzw. den großen Unterschieden zwischen dem Röntgenbild und dem erhobenen operativen Befund liegen (Rupp S, 2003). Weiterhin wurde in Untersuchungen an Sehnen von Patienten mit einer Tendinitis calcarea weder in den betroffenen Sehnen noch im

gesunden Vergleichsgewebe mRNA von Kollagen X nachgewiesen (Oliva F, 2011), ein Hinweis darauf, dass BMPs, speziell BMP-2 und -7, evt. bei dieser Erkrankung eine größere Rolle in der chondroiden Metaplasie spielen als Kollagen X.

6.6. Expression der Entzündungsfaktoren

Es ist bekannt, dass die Bursa subacromialis auf periartikuläre Schultererkrankungen mit chronisch-entzündlichen Veränderungen reagiert (Gotoh M, 2001; Voloshin I, 2005). Tatsächlich wurden alle bewerteten Bursae in unserer Studie als stark (20/21) oder mäßig (1/21) entzündet eingeschätzt. Oft war bei den Patienten mit RM-Ruptur auch eine entzündete Bursa zu finden (16/21). Unsere Untersuchungsergebnisse zeigten jedoch überraschenderweise ein vergleichbares Transkriptionsniveau der beiden Entzündungsfaktoren TNF- α und IL-1 β im gesunden Vergleichsgewebe und der entzündeten Bursa. Innerhalb der Bursa subacromialis war die mRNA-Expression für IL-1 β in allen Abschnitten gleich, für TNF- α im acromionnahen Bereich signifikant höher als im zentralen Abschnitt.

Außerdem konnten keine signifikanten Korrelationen (Rangkorrelation nach Spearman) zwischen dem Entzündungsgrad der Bursae und den entsprechenden mRNA-Expressionen von TNF- α ($r=-0,177$; $p=0,576$; $n=25$) oder IL-1 β ($r=0,025$; $p=0,907$; $n=25$) belegt werden.

Interessanterweise gab es auch in der Studie von Benson keinen Zusammenhang zwischen dem mikroskopisch ermittelten Grad der Bursitis und dem post-operativen Verlauf nach Dekompression bei einem Impingement-Syndrom (Benson RT, 2008). Außerdem wurden in der Bursa subacromialis für die Expressionsraten von IL-1 β und TNF- α keine Unterschiede zwischen schwereren kompletten und partiellen RM-Rupturen ermittelt (Shindle MK, 2011). So wird die These unterstützt, dass die synoviale Entzündung der Bursa subacromialis eine eher untergeordnete Rolle in der Genese bzw. dem post-operativen Ausgang von periartikulären Schultererkrankungen spielt (Blaine T, 2005).

In anderen Studien wurde im Gegensatz zu unserer Studie jedoch eine deutliche Expression dieser Entzündungsmediatoren bzw. die Anwesenheit von typischen Entzündungszellen in der Bursa subacromialis bei RM-Rupturen oder anderen Tendinopathien nachgewiesen und daher eine Beteiligung der Bursitis an der Pathogenese der RM-Ruptur postuliert (Sakai H, 2001; Santavirta S, 2004). Dabei wiesen die Bursae subacromiales von Patienten mit RM-Rupturen höhere mRNA-und/oder Proteinmengen von TNF- α und IL-1 β auf als solche von Patienten mit vorderer Instabilität (Blaine TA, 2005; Sakai H, 2001; Voloshin I, 2005); außerdem zeigte

sich auch eine höhere Expression in RM-Rupturen mit begleitender Schultersteifheit bzw. kompletter versus partieller RM-Ruptur (Ko JY, 2008; Gotoh M, 2001).

In unserer Studie wurde der Entzündungsstatus der Bursa subacromialis jedoch lediglich makroskopisch anhand des OP-Befundes beurteilt, der möglicherweise pathologische Veränderungen auf inflammatorischer bzw. degenerativer Basis nicht sicher unterscheiden kann. Tatsächlich zeigten in der Studie von Sarkar et al. die Bursae subacromiales von Patienten mit Tendinitis calcarea, straffem coracoacromialem Ligament und RM-Ruptur keine entzündliche Einwanderung von Leukozyten, sondern lediglich eine erhöhte Anzahl von Zellen in der Bursawand, Proliferation von Endothelzellen sowie die Einlagerung von Fettvakuolen (Sakar K, 2004). Diese Befunde zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Befunden in unserer Studie und weisen eher auf proliferativ-degenerative als auf entzündliche Veränderungen in der Bursa bei RM-Ruptur und anderen periartikulären Schultererkrankungen hin.

Eine solche synoviale Proliferation und Degeneration könnte eine Reaktion auf die erhöhte BMP-Expression in der Bursa sein. So können BMPs (und evt. TGF- β) wohl nicht nur zu entzündungsähnlichen Reaktionen des umgebenden Bindegewebes mit Schwellung und granulationsähnlichem Gewebe beitragen (Lee KB, 2011; Ehnert S, 2010; v. d. Berg, 1998), sondern auch zu physiologischem bzw. pathologischem Gewebsremodeling (Lee KB, 2011; Braem K, 2012; Ehnert S, 2010). Diese Effekte von BMPs können sowohl in TNF- α -abhängiger (Braem K, 2012) als auch in TNF- α unabhängiger Form erfolgen (Daans M, 2008) und somit die Erklärung für die fehlende Korrelation zwischen dem makroskopischen Entzündungsgrad und dem Expressionsniveau der Zytokine sein.

Während einer akuten Entzündung kommt es durch Interleukine zu einer Aktivierung von VEGF mit Induktion der Angiogenese und erhöhten Permeabilität der Gefäße. Die erhöhte Gefäßdichte bleibt bei chronischen Entzündungsvorgängen bestehen und es kommt zusätzlich zu einer Ansammlung von Lipiden und fibrösen Gewebe (Salven P, 2002). Diese Veränderungen (erhöhte Gefäßdichte und Ansammlung von Fettvakuolen) waren auch in unseren pathologischen Bursae erkennbar, v.a. im zentralen Abschnitt. In der aktuellen Arbeit muss von einer seit längerem bestehenden Bursitis ausgegangen werden, da die untersuchten Patienten erst nach einem längerem Beschwerdeintervall (durchschnittlich 16,5 Monate; s. Kapitel 5) und zunächst konservativen Therapieversuchen (z.B. NSAR zur Analgesie) zur Operation vorgestellt wurden. Untersuchungen zur Frakturheilung im Tiermodell konnten zeigen, dass NSAR die Expression von IL-1 β vermindert, Entzündungsvorgänge hemmt und die Vaskularisation in der frühen Phase der Kallusbildung erhöht und so die Bruchheilung

verzögert (Lu C, 2012). Es wird daher angenommen, dass der Gebrauch von NSAR zur Reduzierung des Schulterschmerzes bei periartikulären Erkrankungen die Expression von IL-1 β vermindert. Weiterhin könnte eine Erklärung für die niedrigere Expression von Entzündungsfaktoren und VEGF in der vorliegenden Arbeit der unterschiedliche Untersuchungszeitpunkt (frühzeitige vs. spätere Op) der entnommenen Bursa im Vergleich zu anderen Studien sein (Sakai H, 2001; Santavirta S, 2004; Blaine, TA 2005; Voloshin I, 2005).

6.7. Pro und Contra bezüglich der Bursektomie bei operativer Versorgung von periartikulären Schultererkrankungen

Zum operativen Umgang mit der Bursa subacromialis im Rahmen von rekonstruktiven Eingriffen an der RM bei Tendinopathien (Akromioplastik, Débridement, Rekonstruktion der Ruptur, subacromiale Dekompression, alleinige Bursektomie) liegen unterschiedliche Studien und Lehrmeinungen vor (Donigan J, 2011), da die Bursa einerseits als pathogenes Gewebe mit einer Bedeutung für Schmerz und Re-Ruptur-Risiko und andererseits als (post-operativ) reparatives, funktionell relevantes Gewebe betrachtet werden kann.

Verschiedene Studien sprechen sich dabei gegen eine Entfernung der reparativen, gefäßreichen Bursa aus, wegen der lokalen Expression von Wachstumsfaktoren wie TGF- β , b-FGF und VEGF, die eine Einsprossung von Gefäßen induzieren und den post-operativen Einheilungsprozess der rupturierten Sehne unterstützen können (Uthoff HK, 2000; Würzler-Hauri CC, 2007; unsere Studie). So ist bekannt, dass Tenozyten selbst nur eine begrenzte proliferative Kapazität besitzen und die Sehnen-Knochen-Integrität durch diese Wachstumsfaktoren mittels Stimulation von Zellaktivität und Produktion von Matrix- und Kollagenproteinen optimiert werden kann (Chen CH, 2011; Pauly S et al., 2011).

Zahlreiche andere klinische und experimentelle Studien empfehlen hingegen die Bursektomie. Durch die Expression der Zytokine TNF- α und IL- β bzw. der BMPs in der Bursa wird nach Literaturbefunden nämlich die Entzündungsreaktion aufrechterhalten sowie ein Teil der chronisch-entzündlichen Veränderung der Bursa sowie des umliegenden Gewebes verursacht (Yanagisawa K, 2001; Blaine TA, 2005; Sakai H, 2001; Daans M, 2008). Eine andere Studie zeigte zudem, dass es unter einer Blockade bzw. Entzug von TNF- α zu einer qualitativ besseren Heilung der operativ versorgten RM-Ruptur kommt (Gulotta LV, 2011).

Studien zum Outcome eines operativ versorgten Impingementsyndroms konnten nachweisen, dass das Re-Operationsrisiko nach isolierter Bursektomie niedriger war als bei einer

Akromioplastik ohne Bursektomie (7,7% vs. 10%) und die Patienten über weniger Bewegungseinschränkungen klagten (Henkus HE, 2009). Ein Grund dafür könnte sein, dass eine Erweiterung des subacromialen Raums durch eine Akromioplastik (d. h. die Beseitigung von extrinsischen Faktoren) einen geringeren Einfluss auf die weitere Degeneration der Sehnen der RM hat als eine Entfernung der Bursa, die über ihre chondroide Metaplasie/Entzündung zu pathogenetisch relevanten, intrinsischen Komponenten des Impingementsyndroms und der RM-Ruptur beiträgt (Machida A et al., 2004; Henkus HE, 2009; Donigan JA, 2011).

Außerdem spielt die Bursa subacromialis eine entscheidende Rolle für die Schmerzgenerierung im subacromialen Raum. Immunhistochemische Untersuchungen und elektronenmikroskopische Bilder belegen eine höhere Dichte von freien Nervenendigungen bzw. Menge der Substanz P in der Bursa subacromialis als im umliegenden Gewebe. Die Menge der Substanz P korreliert dabei positiv mit dem subjektiven Schmerzniveau der Patienten (Gotoh M, 2001). Damit übereinstimmend wurde die Schmerzsymptomatik bei einem Impingement bzw. einer RM-Ruptur durch RM-Reparatur mit einer Bursektomie stärker reduziert als bei einer Akromioplastik bzw. RM-Reparatur allein ohne Bursektomie (Tomonaga A, 2000; Vaz S, 2000; Mashida, M 2004; Blaine TA, 2005). Die Schmerzlinderung war dabei für die Patienten von größerer klinischer Bedeutung als die Vermeidung einer möglichen Bewegungseinschränkung (Henkus HE, 2009).

Auch die Ergebnisse unserer Studie unterstützen eine Bursektomie als Co-Therapie in der operativen Versorgung von periartikulären Schultererkrankungen. So wurden in der Bursa subacromialis histologisch eindeutige degenerative Veränderungen beobachtet (verdickte Kapsel und zahlreiche Fettvakuolen). Außerdem fanden sich auf der Basis der Expression bzw. Aktivität von Kollagen I, II, III und X sowie BMP-2/7, Aggrekan, TGF- β und Alkalischer Phosphatase klare Hinweise auf eine Fibrose bzw. chondroide Metaplasie, in beiden Fällen mit einer Betonung der Befunde im acromionnahen Abschnitt.

Der Grad der fibrotischen Veränderungen in der RM korreliert bekannterweise mit dem Beschwerdegrad (Henkus HE, 2009). Die chondroide Metaplasie wird als weiterer intrinsischer Faktor in der Genese degenerativer Veränderungen der RM und für die Tendinitis calcarea angesehen (Rupp S, 2003). Nach operativer Versorgung einer traumatischen RM-Ruptur ohne Bursektomie kann sich diese Metaplasie auf den neuen Sehnenansatz ausdehnen und die Einheilung der Sehne stören, z. B. wegen der vermehrten Expression von BMP-7 und b-FGF (Fuhrmann R, 2004). Da die Bursa subacromialis in unserer Studie ebenfalls BMP-7 und -2 exprimiert, könnte eine Bursektomie das Risiko einer

knorpeligen Dedifferenzierung und Schwächung des neuen Sehnenansatzes reduzieren. Tatsächlich zeigten auch die resezierten Bursae von lahmen Hunden heterotope Ossifikation und eine Entfernung der Bursae führte zu einer deutlich verbesserten Bewegung des Hundes (McKee WM, et al. 2007).

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen unterstützen auch die Durchführung einer partiellen, vorzugsweise acromionnahen Bursektomie (Ishii H, 1997). Ziel wäre wiederum die Verhinderung der chondroiden Metaplasie des neuen Sehnenansatzes, ausgehend vom acromionnahen Abschnitt der Bursa. Im acromionfernen Abschnitt in der Nähe des neuen Sehnenansatzes könnte dagegen evt. der lokal begrenzte positive Effekt von BMP zur Erzeugung einer besseren Sehnen-Knochen-Integrität genutzt werden (Chen CH, 2011). Die Hauptaufgabe der operativen und konservativen Therapie ist dabei, im vulnerablen Zeitraum von bis zu 3 Monaten nach der Operation Re-Rupturen zu vermeiden, die in Abhängigkeit von Art, Größe und Dauer der ursprünglichen RM-Ruptur, Sehnenqualität und Fettgewebsinfiltration der Sehne zwischen 13 und 49% der operierten Patienten betreffen (Chen CH et al., 2011; Chaudhury S et al., 2011; Miller BS et al., 2011). Als weitere konservative bzw. minimal-invasive Möglichkeit wäre die Blockade einzelner Entzündungsfaktoren, beispielsweise $\text{TNF-}\alpha$, durch lokale Injektion spezifischer neutralisierender Antikörper denkbar (Sakai H, 2001; Voloshin I, 2005; Gulotta LV et.al, 2011; Bedi A, 2012).

Die Bursa subacromialis könnte durch die beschriebenen Veränderungen und mRNA-Expressionen der spezifischen Moleküle, insbes. Kollagen I, X, BMP-2, BMP-7 und $\text{TGF-}\beta$, besonders im ihrem acromionnahen Abschnitt einen pathogenetischen Einfluss auf das umgebende Gewebe, z. B. die Ansatzsehnen der RM, ausüben und so zum Verlust elastischer Eigenschaften und RM-(Re)Rupturen beitragen. Aus diesen Ergebnissen könnte eine Empfehlung zur (partiellen) Bursektomie bei rekonstruktiven/dekomprimierenden Eingriffen im subacromialen Raum abgeleitet werden.

7. Schlussfolgerung

Die untersuchte Patientenkohorte war bezüglich der Geschlechts- und Altersverteilung, des Anteils der zugrunde liegenden periartikulären Schultererkrankungen und deren Ursachen, der betroffenen rupturierten RM-Muskeln sowie der beobachteten Begleit-Bursitis der Bursa subacromialis repräsentativ.

Die Bursa subacromialis wurde im Rahmen operativer Eingriffe an RM bzw. am subacromialem Raum entnommen. Für die histologischen, molekularbiologischen und biochemischen Untersuchungen wurde die Bursa in einen acromionnahen, zentralen und acromionfernen Abschnitt gegliedert. Histologisch konnten degenerative Veränderungen in der Bursa subacromialis gezeigt werden, mit Betonung im acromionnahen Abschnitt.

Auf der mRNA-Ebene ergab sich bei der Betrachtung der gesamten Bursa subacromialis im Vergleich zu gesunden Synovialmembran eine signifikante Erhöhung des Matrixproteins Kollagen II und eine numerische Erhöhung der Matrixproteine Kollagen I, III, X und Aggrecan sowie der Wachstumsfaktoren TGF- β , bFGF, BMP-2 und -7. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Regionen der Bursa subacromialis zeigten sich für Kollagen I, X und Aggrecan sowie für die Wachstumsfaktoren TGF- β , bFGF und BMP-7. Die höchsten Werte waren jeweils acromionnah zu verzeichnen. Die Expression der Entzündungsfaktoren wies nur geringe regionale Unterschiede auf.

Die semiquantitative Protein-Analyse ergab eine regional gleichmäßige Präsenz des Matrixproteins Kollagen I. Kollagen II-Ablagerungen zeigten sich im zentralen und acromionfernen Abschnitt. Kollagen X wurde lediglich acromionnah und acromionfern detektiert. Die Aktivität von Alkalischer Phosphatase bzw. die Expression der BMPs war in der acromionnahen und zentralen Region der Bursa subacromialis betont.

Es kommt also in der Bursa subacromialis zu einer verstärkten Ablagerung der Bindegewebs-Kollagene I und III im Sinne einer Fibrose. Die Expression/Synthese von knorpel- und knochenspezifischen Matrixmolekülen (Kollagen II, X und Aggrecan), BMP-2 und -7 sowie die Aktivität von Alkalischer Phosphatase weisen auf eine chondroide Metaplasie mit starker Betonung im acromionnahen und zentralen Bereich der Bursa hin. Niedrige CrP-Werte im Blut sowie fehlende Korrelationen zwischen makroskopischem Entzündungsgrad der Bursa und lokaler mRNA-Expression von IL-1 β und TNF- α sprechen eher für degenerativ/proliferative Veränderungen als für eine akute Entzündung der Bursa.

Schlussfolgerung

Die Veränderungen der Bursa subacromialis besonders im acromionnahen Abschnitt könnten sich auf das umgebende Gewebe, z. B. die Ansatzsehnen der RM, auswirken, zum Verlust elastischer Eigenschaften und RM-(Re)Rupturen führen und damit pathogenetisch relevant sein. Aus diesen Ergebnissen könnte eine Empfehlung zur (partiellen) Bursektomie bei rekonstruktiven/dekomprimierenden Eingriffen im subacromialen Raum abgeleitet werden.

8. Literaturverzeichnis

- Aigner TKG, Fairbank JC, von der Mark K, Urban JP 1998
Variation with age in the pattern of type X collagen expression in normal and scoliotic human intervertebral discs. *Calcified Tissue International* 63(3): 263-268
- Balemans W, v. Hul W, 2002
Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev Biol* 250(2):231-250
- Beals TC, Harryman DT, Lazarus MD 1998
Useful Boundaries of the Subacromial Bursa. *Arthroscopy* 14 (5):465-470
- Beckmann, J 2011
Erkrankungen und Verletzungen von Schultergürtel und Schultergelenk
Orthopädie und Unfallchirurgie
- Bedi A, Maak T, Walsh C, Rodeo S, Grande D, Dines D, Dines J 2012
Cytokines in the rotator cuff degeneration and repair. *J of Shoulder Elbow Surg* 21, 218-227
- Benya PD, Padilla SR, Nimni ME. 1978
Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell*, 15 (4):1313-1321
- Benjamin M, Ralphs JRR 1998
Fibrocartilage in tendons and ligaments-an adaptation to compressive load. *J Anat.* 194:481-494
- Benson RT, McDonnell SM, Rees JL, Athanasou NA, Char AJ 2009
The morphological and immunocytochemical features of impingement syndrome and partial-thickness rotator cuff tear in relation to outcome after subacromial decompression. *J Bone Joint Surg* 91(1): 119-123
- Birnbaum K, Lierse W 1992
Anatomy and function of the bursa subacromialis. *Acta Anatomica* 145:354-363
- Blaine TA, Kim YS, Voloshin I, Chen D, Murakami K, Chang SS, Winchester R, Lee FY, O'keefe RJ, Bigliani LU 2005
The molecular pathophysiology of subacromial bursitis in rotator cuff disease. *J of Shoulder and Elbow Surgery* 14:84-89
- Bobacz K, Sunk IG, Hayer S, Amoyo L, Tohidast-Akrad M, Kollias G, Smolen JS, Schett G 2008
Differentially Regulated Expression of Growth Differentiation Factor 5 and Bone Morphogenetic Protein 7 in Articular Cartilage and Synovium in Murine Chronic Arthritis. *Arthritis and Rheumatism* Vol. 58 No.1:109-118
- Boehm TD, Rolf O, Baumann B, Glatzel H, Wollmerstedt N 2005
Vergleich der funktionellen Ergebnisse und Rekonstruktion der Rotatorenmanschette bei Patienten vor und nach der 6. Lebensdekade. *Oberer Extremität* Vol. 1, Nummer 1, S. 2-7

- Braem K, Deroose CM, Luyten FP, Lories RJ 2012
Inhibition of inflammation but not ankylosis by glucocorticoids in mice: further evidence for the enthesal stress hypothesis. *Arthritis Res Ther.* Mar12; 14
- Broadley KN, Aquino AM, Woodward SC, Buckley-Sturrock A, Sato Z, Rifkin DB, Davidson JM 1989
Monospecific antibodies implicate basic fibroblastic growth factor in normal wound healing. *Lab Invest* 61(5):571-575
- Bühling KJ 2000
Entzündung. Intensivkurs: Allgemeine und spezielle Pathologie. München/Jena, Urban & Fischer 2. Auflage 57-78
- Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. 2001
Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98 (8):2396-2402
- Chaudhury S, Dines JS, Delos D, Warren RF, Voigt C, Rodeo SA, 2011
The role of fatty infiltration in the pathophysiology and outcomes of rotator cuff tears. *Arthritis Care Res* 2012 Jan;64(1):76-82
- Chen CH, Chang CH, Wang KC, Su CI, Liu HT, Yu CM, Wong CB, Wang IC, Whu SW, Liu HW 2011
Enhancement of rotator cuff tendon-bone healing with injectable periosteum progenitor cells-BMP-2 hydrogel in vivo. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* Sep;19(9):1597-607
- Chen D, Ji X, Harris MA, Feng JQ, Karsenty G, Celeste AJ, Rosen V, Mundy GR 1998
Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineage. *J Cell Biol.* Volume 142 1:295-205
- Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He TC 2003
Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMP). *J Bone Joint Surg* 85-A(8):1544-1552
- Clark J, Stechschulte jr. DJ 1998
The interface between bone and tendon at an insertion site: a study of the quadriceps tendon insertion. *J Anat.* 192:605-616
- Codman EA
The shoulder: Rupture of the supraspinatus tendon and other lesions in or about the subacromial bursa. Boston: Thomas Todd 1943
- Cullinane MD, Lietman SA, Inoue N, Deitz LW, Chao E 2002
The effect of recombinant human osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) impregnation on allografts in a canine intercalary bone defect. *J Orthop Res* 20:1240-1245

- Daans M, Lories R, Luyten FP 2008
Dynamic activation of bone morphogenetic protein signaling in collagen-induced arthritis supports their role in joint homeostasis and disease. *Arthritis Res Ther.* **10**:R115
- Deutzmann R, Bruckner-Tuderman L, Bruckner P. 2003
Binde- und Stützgewebe. In: Löffler G, Petrides PE
Biochemie und Pathobiochemie. 8te Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer., 754-787
- Desai S 2001
Prevention of IGF-1 and TGF β stimulated typ II collagen and decorin expression by bFGF and identification of IGF-1 mRNA transcripts in articular chondrocytes. *Matrix Biol* 20:233-242
- Doege KJ, Fessler JH 1986
Folding of carboxyl domain and assembly of procollagen. *J Biol Chem* 261:8923-8935
- Donigan JA, Wolf BR, 2011
Arthroscopic subacromial decompression: acromioplasty versus bursectomy alone-does it really matter? A systematic review. *Iowa Orthop J* 31; 121-126
- Dorman LJ Tucci M, Benghuzzi H 2012
In vitro effects of bmp-2, bmp-7, and bmp-13 on proliferation and differentiation of mouse mesenchymal stem cells. *Biomed Sci Instrum.* 48:81-87
- Ducy P, Karsenty G 2000
The family of BMP. *Kidney International* 57(6):2207-2214
- Ehnert S, Baur J, Schmitt A, Neumaier M, Lucke M, Dooley S, Vester H, Wildemann B, Stöckle U, Nussler A 2010
TGF- β_1 As possible link between loss of bone mineral density and chronic inflammation. *plosONE* Vol 5 Issue 11
- Enomoto H, Inoki I, Komiya K, Shiomi T, Ikeda E, Obata K, Matsumoto H, Toyama Y, Okada Y 2003
Vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors are expressed in human osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol* 162 (1):171-181
- Eriksen HA, Pajala A, Leppilahti J, Risteli J 2002
Increased content of type III collagen at the rupture site of human Achilles tendon. *J Orthop Res* 20:1352-1357
- Ferrera N, Gerber HP 2001
The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol.* 106:148-156
- Fessler JH, Duncan KJ, Fessler LI 1985
Biosynthesis of collagen. *J Cell Biochem* 28:31-37
- Fibbe WE. 2002
Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair. *Ann Rheum. Dis.* 61 Suppl 2:ii29-31

Flik KR, Verma N, Cole BJ, Bach BR 2007
Articular cartilage. 1-12

Fosang AJ, Last K, Maciewicz RA 1996
Aggrecan is degraded by matrix metalloproteinases in human arthritis. Evidence that matrix metalloproteinase and aggrecanase activities can be independent. J Clin Invest. 15;98(10):2292-2299

Fuhrmann R, Mollenhauer J, Leutloff A, Wiederanders B, Venbrocks R 2002
Insertion of the supraspinatus tendon: microstructural and molecular architecture representing a dual-function structure to compensate tension and pressure. Orthopedic Research Society 27:608

Fukui N, Zhu Y, Maloney WJ, Clohisy J, Sandell LJ 2003
Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes. J Bone Joint Surg Am 3:59-66

Fukuda H, Hamada K, Yamanaka K 1989
Pathology and Pathogenesis of Bursal-Side Rotator Cuff Tear Viewed From En Bloc Histologic Sections. Clin Ortho Rel Res 75-80

Galatz L, Rothermich S, VanderPloeg K, Petersen B, Sandell L, Thomopoulos S 2007
Development of the supraspinatus tendon-to-bone insertion: localized expression of extracellular matrix and growth factor genes. J Orthop Res 25:1621-1628

Gelse K, Poschl E, Aigner T. 2003
Collagens-structure, function, and biosynthesis. Adv Drug Deliv Rev 55 (12):1531-1546

Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N 1999
VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis enchondrale bone formation. Nat Med 5:623-628

Gohlke F, Hedtmann A 2002
Schulter Das Standardwerk für Klinik und Praxis. Thieme Verlag

Gotoh M, Hamada K, Yamakawa H, Yanagisawa K, Nakamura M, Yamazaki H, Ueyama Y, Tamaoki N, Inoue A, Fukuda H 2001
Interleukin-1-induced subacromial synovitis and shoulder pain in rotator cuff diseases. Rheumatology 40:995-1001

Gotoh M, Hamada K, Yamakawa H, Yanagisawa K, Nakamura M, Yamazaki H, Inoue A, Fukuda H 2002
Interleukin-1-induced glenohumeral synovitis and shoulder pain in rotator cuff diseases. J. Orthop Res. 2002 Nov; 20 (6):1365-71

Grifka J 2007
Praxiswissen Halte- und Bewegungsorgane Sportverletzung – Sportschäden, Thieme Verlag

- Gulotta LV, Kovacevic D, Cordasco F, Rodeo SA 2011
Evaluation of tumor necrosis factor α blockade on early tendon-to-bone healing in a rat rotator cuff repair model. *Arthroscopy* 27(10):1351-1357
- Gumpert N 2012
Die optimale Therapie des Impingementsyndrom
- Hall LC, Middlebrook EE, Dickerson CR 2010
Analysis of the influence of rotator cuff impingements on upper limb kinematics in an elderly population during activities of daily living. *Clin Biomech* 26 (2011) 579-584
- Hanada K., Dennis JE, Caplan AI 1997
Stimulatory effects of basic fibroblastic growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenetic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Bone and Miner Res* 12(10): 1606-1614
- Hamada K, Tomonaga A, Gotoh M, Yamakawa H, Fukuda H 1997
Intrinsic healing capacity and tearing process of torn supraspinatus tendon: in situ hybridization study of alpha I (I) procollagen mRNA. *J Orthop Res* 15(1): 24-32
- Handa A, Gotoh M, Hamada K, Yanagisawa K; Yamazaki H, Nakamura M, Ueyama Y, Mochida J, Fukuda H 2003
Vascular endothelial growth factor 121 and 165 in the subacromial bursa are involved in shoulder joint contracture in type II diabetes with rotator cuff disease. *J Orthop Res* 1138-44
- Henkus HE, Witte PB, Nelissen RG, Brand R, Arkel van E 2009
Bursectomy compared with acromioplasty in the management of subacromial impingement Syndrome. *J Bone Joint Surg Vol* 91-B; 504-510
- Hirata H, Nagakura T, Tsujii M, Morita A, Fujisawa K, Uchida A 2004
The relationship of VEGF and PGE2 expression to extracellular matrix remodelling of the tenosynovium in the carpal tunnel syndrome. *J Pathol* 204 (5):605-612
- Hollister MA, Mack LA, Patten RM, Winter TC, Matsen FA, Veith RR 1995
Association of sonographically detected subacromial/subdeltoid bursal effusion and intraarticular fluid with rotator cuff tear. *Am J Roentgenol* 165: 605-608
- Hoffmann H., Fietzek PP., Kuhn K. 1978
The role of polar and hydrophobic interactions for the molecular packing of type I collagen: a three-dimensional evaluation of the amino acid sequence". *J Mol Biol* 125:137-165
- Ishii H, Brunet JA, Welsh RP, Uthoff HK 1997
Bursal reactions in rotator cuff tearing, the impingement syndrome, and calcifying tendinitis". *J Shoulder Elbow Surg* 6 (2): 131–136
- Ishimaru T, Komura M, Komura H, Otani Y, Komuro H, Sugiyama M, Terawaki K, Suzuki K, Tabata Y, Iwanaka T 2013
Slow release of basic fibroblast growth factor (b-FGF) promotes growth of tracheal cartilage. *J Ped Surg* 48; 288-292

- Itoi E, Tabata S 1992
Conservative treatment of rotator cuff tears. Clin Orthop.; 275: 165-173
- Ji X, Chen D, Xu C, Harris SE, Mundy GR, Yoneda T 2000
Pattern of gene expression associated with BMP-2-induced osteoblast and adipocyte differentiation of mesenchymal progenitor cell 3T3-F442A. J Bone Miner Metab 18:132-139
- Junqueira LC, Carneio J 1996
Knorpel. Histologie. Berlin Heidelberg New York, Springer. 4. Auflage 140-170
- Katagiri T, Yamagushi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T 1994
Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. J Cell Biol 127(Pt 1):1755-1766
- Kübler NR, 2006
Osteoinduktion: Ein Beispiel für die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen durch Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)
- Knudsen HB, Gelineck J, Søjbjerg JO, Olsen BS, Johannsen HV, Sneppen O 1999
Functional and magnetic resonance imaging evaluation after single-tendon rotator cuff Reconstruction. J Shoulder Elbow Surgery 8(3):242-246
- Kim HN, Min WK, Jeong JW, Kim SG, Kim JR, Kim SY, Choi JY, Park BC 2011
Combination of RUNX2 and BMP -2 increases conversion of human ligamentum flavum cells into osteoblastic cell. BMP Reports 446-451
- Ko JY, Wang FS, Huang HY, Wang CJ, Tseng; SL, Hsu C 2008
Increased Il-1beta expression and myofibroblast recruitment in subacromial bursa is associated with rotator lesions with shoulder stiffness. J Orthop Res 26(8):1090-1097
- Kobayashi K, Hamada K, Gotoh M, Handa A, Yamakawa H, Fukuda H 2001
Healing full-thickness tears of avian supracoracoid tendons: in situ hybridization of a1(I) and a1(III) procollagen mRNA. J Orthop Res 19:862-868
- Kuivaniemi H, Tromp G, Chu ML, Prockop DJ 1988
Structure of a1 full-length cDNA clone for the pro alpha2(I) chain of human type I procollagen. Comparison with the chicken gene confirms unusual patterns of gene conservation. J Biochem 252: 633-640
- Kumar P, Wang JM, Bernabeu C. 1996
CD 105 and angiogenesis. Journal of Pathology 178 (4):363-366
- Kühn K 1986
The collagen family-variations in the molecular and supramolecular structure. Rheumatology 10: 29-69
- Lee PL, Johnson DE, Cousens LS, Fried VA 1989
Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic growth factor. Science 245:57-60

- Lee KB, Murray S, Taghavi CE, Song KJ, Brochmann, E, Johnson JS, Keorochana G, Liao JC, Wang JC, 2011
Bone morphogenetic protein-binding peptide reduces the inflammatory response to recombinant human bone morphogenetic protein-2 and recombinant human bone morphogenetic protein-7 in a rodent model of soft-tissue inflammation. *Spine J* 11 568-576
- Lee SB, Nakajima T, Luo ZP, Zobitz ME, Chang YW, An KA 2000
The bursal and articular sides of the supraspinatus tendon have a different compressive stiffness. *Clin Biomech* 15:241-247
- Li X, An A, Ellman M, Phillips F, Thonar EJ, Park DK, Udayakumar RK, Im HJ 2008
Action of fibroblast growth factor-2 on the intervertebral disc. *Arthritis Res Ther.* 10(2):R48
- Lo IK, Boorman R, Marchuk K, Hollinshead R, Hart DA, Frank CB 2005
Matrix molecule mRNA levels in the bursa and rotator cuff of patients with full-thickness rotator cuff. *Arthroscopy* 21(6):645-51
- Löhr JF, Uhthoff, HK 2007
Epidemiologie und Pathophysiologie der Rotatorenmanschettenrupturen. *Orthopäde* 36:788-795
- Lories R, Derese I, Ceuppens JL, Luyten FP 2003
Bone morphogenetic protein 2 and 6, expressed in arthritis synovium, are regulated by proinflammatory cytokines and differentially modulate fibroblast-like synoviocyte apoptosis. *Arthritis Rheum* 48(10):2807-18
- Lories R, Derese I, Luyten FP 2005
Modulation of bone morphogenetic protein signaling inhibits the onset and progression of ankylosing enthesitis. *J. Clin Invest* 115:1571-1579
- Löffler G, Petrides P 1997
Binde- und Stützgewebe. *Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin Heidelberg New York, Springer. 5. Auflage S. 733-760
- Longo UG, Franceschi F, Ruzzini L, Rabitti C, Marini S 2007
Light microscopic histology of supraspinatus tendon ruptures. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 15:1390-1394
- Lu C, Xing Z, Wang X, Mao J, Marcucio RS, Miclau T 2012
Anti-inflammatory treatment increases angiogenesis during early fracture healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 132(8):1205-13
- Machida A, Sugamoto K, Miyamoto T, Inui H, Watanabe T, Yoshikawa H 2004
Adhesion of the subacromial bursa may cause subacromial impingement in patients with rotator cuff tears. *Acta Orthopaedica* 75:1,109-113
- McKee WM, Macias C, May C, Scurrall EJ 2007
Ossification of the infraspinatus tendon-bursa in 13 dogs. *Vet Rec*; 161(25):846-52

- Majumdar MK, Wang E, Morris EA 2001
BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *J Cell Physiol* 189(3):275-284
- Marie P 1997
Growth factors and bone formation in osteoporosis. Roles for IGF-1 and TGF-beta. *Revue du rhumatisme* 64(1):44-54
- Martin GR 1998
The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes Dev* 12:1571-1586
- Mayerhöfer MW, Breitenseher MJ 2004
Schulterimpingement. *Der Radiologe* 569-7577
- Meyer CD, Pirkle C, Pfirrmann CWA, Zanetti M, Gerber C 2005
Asymmetric atrophy of the supraspinatus muscle following tendon tear. *J Orth Res* 23:254-58
- Milgrom C, Schaffler M, Gilbert S, Holsbeck M 1995
Rotator-cuff changes in asymptomatic adults. The effect of age, hand dominance and gender. *J bone Joint Surg Br.*; 77-B:296-298
- Milgrom C, Novack V, Weil Y, Jaber S, Radeva-Petrova DR, Finestone A 2008
Risk factors for idiopathic frozen shoulder. *Isr Med Assoc J* 10(5):361-364
- Miller BS; Downie BK, Kohen RB, Kijek T, Lesniak B, Jacobson JA, Hughes RE, Carpenter JE 2011
When do rotator cuff repairs fail? Serial Ultrasound examination after arthroscopic repair of large and massive rotator cuff tears. *Am J Sports Med* 39(10):2064-70
- Murrell GAC, Walton JR 2001
Diagnosis of rotator cuff tear. *The Lancet* 357 10:769-770
- Nakajima FOA., Gotoh K., Morizy H., Ninomiya Y., Einhorn T., Yamazaki M. 2001
Spatial and temporal gene expression in chondrogenesis during fracture healing and the effects of basic fibroblastic growth factor. *CMLS* 57: 943-956
- Nakahara H, Dennis JE, Bruder SP, Haynesworth SE, Lennon DP, Caplan AI. 1991
In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp Cell Res* 195 (2):492-503
- Nathanson MA 1985
Bone matrix-directed chondrogenesis of muscle in vitro. *Clin Orthop Rel Res* (200):142-158
- Neer CS, 1983
Impingement Lesions. No 173 *Clin Orthop Rel Res* 71-77
- Netter, FH 2000
Atlas der Anatomie des Menschen; 2. überarbeitete und erweiterte Auflage.
Novartis AG, Basel Stuttgart New York Thieme Verlag

- Neuwirth J, Fuhrmann RA, Veit A, Aurich M, Stonans I, Trommer T, Hortschansky P, Chubinskaya S, Mollenhauer JA 2005
Expression of bioactive bone morphogenetic proteins in the subacromial bursa of patients with chronic degeneration of the rotator cuff. *Arth Res*
- Oguchi T, Ishiguro N 2004
Differential Stimulation of Three Forms of Hyaluron Synthase by TGF- β , IL-1 β and TFN- α
Connective Tissue Research 45:197-205
- Oguma H, Murakami G, Takahashi-Iwanaga H, Aoki M, Ishii S 2001
Early anchoring collagen fibers at the bone-tendon interface are conducted by woven bone formation: a light microscope observation using canine model. *J Orthop Res*. 19:873-880
- Oliva F, Barisani D, Grasso A, Maffulli N 2011
Gene expression analysis in calcific tendinopathy of the rotator cuff. *Cells and Materials* 21:548-577
- Ozaki J, Fujimoto S, Nakagawa Y, Masuhara K, Tamai S 1988
Tears of the rotator cuff of the shoulder associated with pathological changes in the acromion. A study in cadaver. *Am. Journal Bone Joint Surg Sep*;70(8):1224-1230
- Ozkaynak E, Schnegelsberg PN, Oppermann H 1991
Murine osteogenetic protein (OP-1): high levels of mRNA in kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 179(1):116-123
- Pauly S, Klatte F, Strobel C, Schmidmaier G, Greiner S, Scheibel M, Wildemann B 2011
BMP-2 and BMP-7 affect human rotator cuff tendon cells in vitro. *J Elbow Surg* 1-10
- Pelissier P, Masquelet AC, Bareille R, Pelissier AM, Amedee J 2004
Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration. *J Orthop Res* 22:73-79
- Perrier E, Ronzière MC, Bareille R, Pinzano A, Mallein-Gerin F, Freyria AM, 2011
Analysis of collagen expression during chondrogenic induction of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett* 2011 Oct;33(10):2091-101
- Petersen W, Pufe H, Kurz B, Mentlein R, Tillmann B 2002
Angiogenesis in fetal tendon development: spatial and temporal expression in the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor. *Anatomy and Embryology* 05: 263-270
- Pfeilschifter J, Mühl H 1990
Interleukin 1 and tumor necrosis factor potentiate angiotensin II- and calcium ionophore-stimulated prostaglandin E2 synthesis in rat renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 15;169(2):585-595
- Pufe H, Petersen W, Tillmann B, Mentlein R 2001
The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor is expressed in foetal and ruptured tendons. *Virchows Archiv* 439: 579-585

- Pufe T, Harde V, Petersen W, Goldring MB, Tillmann B, Mentlein R 2004
Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces matrix metalloproteinase expression in immortalized chondrocytes. *J Pathol.* 202(3):367-74
- Rahme H, Nordgren H, Hamberg H, Westerberg CE 1993
The subacromial bursa and the impingement syndrome. *Acta Orthopaedica* 64(4):485-488
- Reddi AH, Huggings CB 1972
Citrate and alkaline phosphatase during transformation of fibroblasts by the matrix and minerals of bone. *Proc soc Exp boil med* 140(3):807-810
- Rickert M, Georgousis H, Witzel U 1998
Die native Reißfestigkeit der Sehne des M. supraspinatus beim Menschen. Eine biochemische Untersuchung. *Unfallchirurgie* 101:265-270
- Riley E, lane J, Urist M, Lyons K, Liebermann J 1996
Bone Morphogenetic protein-2: Biology and Application. *Clinical Orthopedia* 324:39-46
- Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH et al. 1986
Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Jun; 83(12):4167-71
- Roberts AB, Sporn MB 1989
Regulation of endothelial cell growth, architecture, and matrix synthesis by TGF-beta. *Am Rev Respir Dis* 140 (4):1126-1128
- Roberts AB, Sporn MB 1993
Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors* 8 (1):1-9
- Roitt IM, Brostoff J, Male DK 1995
Kurzes Lehrbuch der Immunologie. 3. neubearbeitete Auflage Stuttgart New York Thieme S.97-98, 117-118
- Rokito A, Cuomo F, Gallagher M, Zuckermann J 1999
Long-term functional outcome of repair of large and massive chronic tears of the rotator cuff. *Journal Bone Joint Surg* 81A:991-997
- Roman-Blas JA, Stokes DG, Jimenez SA 2007
Modulation of TGF-beta signalling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* 15(12):1367-1377
- Rosen V, 2006
BMP and BMP inhibitors in bone. *Ann N Y Acad Sci* 1068:19-25

- Roughley PJ, Melching LI, Heathfield TF, Pearce RH, Mort JS 2006
The structural and degradation of aggrecan in human intervertebral disc. *Eur Spine J* 3:326-332
- Rowe CR 1988
Tendinitis, Bursitis, Impingement, “Snapping” Scapula and calcific tendinitis. *The shoulder* New York Chirchill Livingstone: 105-129
- Ruoshlathi E 1988
Structure and biology of proteoglycans. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 4: 229-255
- Rupp S, Seil R, 2003
Tendinosis calcarea der Rotatorenmanschette. *Arthroskopie* 16:185-291
- Ruppert R, Hoffmann H 1996
Human bone morphogenetic protein-2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *Eur J Biochem.* 1;237(1):295-302
- Safran O, Derwin KA, Powell K, Iannotti JP 2005
Changes in rotator cuff muscle volume, fat content, and passive mechanics after chronic detachment in a canine model. *J Bone Joint Surg* 12:2662-2668
- Sailor LZ, Hewick RM, Morris EA 1996
Recombinant human bone morphogenetic protein-2 maintains the articular chondrocyte phenotype in long-term culture. *J Orthop Res* 14(6):937-945
- Sakai H, Fujita K, Sakai Y, Mizuno K 2001
Immunolocalization of cytokines and growth factors in subacromial bursa of rotator cuff tear patients . *Kobe J Med Sci* 47:25-34
- Salven P, Hattori K, Heissig B, Rafii S 2002
Interleukin-1alpha promotes angiogenesis in vivo via VEGFR-2 pathway by inducing inflammatory cell VEGF synthesis and secretion. *FASEB J* 16(11):1471-1472
- Sanyal A, Oursler MJ, Clemens VR, Fukumoto T, Fitzsimmons JS, O’Driscoll SW 2002
Temporal expression patterns of BMP receptors and collagen II (B) during periosteal Chondrogenesis. *J Orthop Res* 20:58-65
- Santavirta S, Konttinen YT, Antti-Poika I, Nordström D 1992
Inflammation of the subacromial bursa in chronic shoulder pain. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 111:336-340
- Sarkar K, Uhthoff HK 2004
Ultrastructure of the subacromial bursa in painful shoulder syndromes. *Virchows Archives* 400:107-117

- Schmal H, Mehlhorn AT, Pilz IH, Dovi-Akue D, Kirchhoff C, Südkamp NP, Gerlach U, Lohrmann C, Niemeyer P 2012
Immunohistological Localization of BMP-2, BMP-7, and their Receptors in Knee Joints with Focal Cartilage Lesions ScientificWorldJourn 2012:467892
- Schneeberger AG, Nyffeler RW, Gerber C 1998
Structural changes of the rotator cuff caused by experimental subacromial impingement in the rat. J Shoulder Elbow Surgery 375-380
- Seeherman H, Li R, Bouxsein M, Kim H, Li J, Smith-Adaline EA, Aiolo M 2006
rhBMP-2/Calcium Phosphate matrix accelerates osteomy-site healing in a nonhuman primate model at multiple treatment times and concentrations. J Bone Joint Surg 88(1):144-159
- Seitz AL, McClure PW, Finucane S, Boardman ND III, Michener LA 2011
Mechanisms of rotator cuff tendinopathy: Intrinsic, extrinsic, or both. Clin Biomech 26:1-12
- Sher JS, Uribe JW, Posada A, Murphy BJ, Zlatkin MB 1995
Abnormal findings on magnetic resonance images of symptomatic shoulders. J Bone Joint surg Am; 77-A(1):10-15
- Shin KM 2011
Partial-thickness rotator cuff tears. Korean Journal of Pain Vol. 24, No. 2, 69-73
- Shindle MK, Chen CT, Robertson C., DiTullio AE, Paulus MC, Clinton CM, Cordasco FA, Rodeo SA, Warren RF 2011
Full-thickness supraspinatus tears are associated with more synovial inflammation and tissue degeneration than partial-thickness tears. J Shoulder Elbow Surg 20, 917-927
- Shintani N, Hunziker EB 2007
Chondrogenetic differentiation of bovine synovium: bone morphogenetic proteins 2 and 7 and transforming growth factor beta 1 induce the formation of different types of cartilaginous tissue. Arthritis Rheum 56(6):1869-1879
- Shirachi I, Gotoh M, Mitsui Y, Yamada T, Nakama K, Kojima K, Okawa T, Higuchi F, Nagata J 2011
Collagen production at the edge of ruptured rotator cuff tendon is correlated with postoperative cuff integrity. Arthroscopy 27(9):1173-9
- Sipe JB, Zhang J, Waits C, Skikne B, Garimella R, Anderson HC 2004
Localization of bone morphogenetic proteins (BMPs)-2, -4, and -6 within megakaryocytes and platelets. Bone 35(6):1316-1322
- Sørensen AK, Bak K, Krarup AL, Thune, CH, Nygaard M, Jørgensen U, Sloth C, Torp-Perdersen S 2007
Acute rotator cuff tear: Do we miss the early diagnosis? A prospective study showing a high incidence of rotator cuff tears after shoulder trauma. J Shoulder Elbow Surgery 174-180

- Southwood L, Frisbie D, Kawcak C, Ghivizzani S, Evans C, McIlwraith 2004
Evaluation of Ad-BMP-2 for enhancing fracture healing in an infected defect fracture rabbit Model. *J Orthop Res* 22:66-72
- Stallenberg B, Destate N, Feipel V, Gevenois PA 2006
Involvement of the anterior portion of the subacromial-subdeltoid bursa in the painful Shoulder. *Am J Roentgenol* 187(4):894-900
- Stevens A, Lowe J. 1997
Supportzellen und extrazelluläre Matrix. Stevens A, Hrsg. *Histologie des Menschen*. 2te Aufl. Weinheim: Chapman & Hall GmbH, 50-64.
- Stewart A Guan H, Yang K 2010
BMP-3 promotes mesenchymal stem cell proliferation through the TGF-beta/activin signaling pathway. *J Cell Physiol* 223(3):658-666
- Sumner DR, Turner TM, Urban RM, Turek T, Seeherman H, Wozney JM 2004
Locally delivers rhBMP-2 enhances bone ingrowth and gab healing in a canine model. *J Orthop Res* 22:58-65
- Teixeira JO, Urist MR 1998
BMP induced repair of compartmentalized segmental diaphyseal defects. *Arch. Orthop. Trauma. Surg.* 117(1-2):27-34
- Thomopoulos S, Hattersley G, Rosen V, Mertens M, Galatz L, Williams GR, Soslowsky LJ 2002
The localized expression of extracellular matrix components in the healing tendon insertion sites: an in situ hybridization study. *J Orthop Res* 20:454-463
- Tillander B, Franzén LE, Nilsson E, Norlin R 2001
Carrageenan-induced subacromial bursitis caused changes in the rat's rotator cuff. *J Orthop Res* 19:441-447
- Tokifumi M, Marchuk L, Sciore P, Shirive NG., Frank CB., Hart DA. 2005
Compressive compared with tensile loading of medial collateral ligament scar in vitro uniquely influences mRNA levels for aggrecan, collagen type II, and collagenase. *J Orthop Res.* Jul;18(4):524-31
- Tomonaga A, Hamada K, Gotoh M, Yamakawa H, Kobayashi K, Fukuda H 2000
Expression of procollagen alpha 1 type III mRNA in rotator cuff tears. *Tokai J Exp Clin Med* 25(3):125-134
- Tsai YH, Huang TS, Hsu WH, Huang KC, Li YY, Peng KT, Hsu RW 2006
Detection of subacromial bursa thickening by sonography in shoulder impingement Syndrome. *Chang Gung Med J* 2007; 30:135-141
- Uhthoff HK, Sano H, Trudel G, Ishil H 2000
Early reactions after reimplantation of the tendon of supraspinatus into bone. *J Bone Joint Surg* 82(7):1072-6

- Uthoff HK, Seki M, Backmann DS, Trudel G, Hirmori K, Sano H 2002
Tensile strength of the supraspinatus after reimplantation into a bony trough: an experimental study in rabbits. *J Shoulder Elbow Surg* 11(5): 504-509
- Vallejo LF, Gueorguieva L, Rinas U, Seidel-Morgenstern A 2006
Discontinuous and continuous separation of the monomeric and dimeric forms of human bone morphogenetic protein-2 from renaturation batches. *J Chromatogr A* 1135(2):142-150
- v. d. Berg WB 1998
Joint inflammation and cartilage destruction may occur uncoupled. *Semin Immunopathol.* 1-2: 149-164
- v.d. Mark K 1999
Structure, Biosynthesis and Gene Regulation of Collagen in cartilage and Bone. *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism.* Academic Press: 3-29
- Vaz S, Pries P, Gayet LE, Soyer J, Iborra JP 2000
Bursectomy and acromial resection in arthroscopic treatment of sub-acromial impingement. *Europ J Orthop Surg Traumat* 10:13-19
- Voloshin I, Gelinas J, Maloney MD, O'keefe RJ, Bigliani LU, Blaine TA 2005
Increased IL-1 β expression and myofibroblast recruitment in subacromial bursa is associated with rotator cuff lesions with shoulder stiffness. *Arthroscopy* 21(9):1076
- Wang JS, Aspenberg P 1993
Basic fibroblast growth factor and bone induction in rats. *Acta Orthop Scand.* 64(5) 557-561
- Weisser J, Rahfoth B, Timmermann A, aigner T, Bräuer R, v.d. Mark K 2001
Role of growth factors in rabbit articular cartilage repair by chondrocytes in agarose. *Osteoarthritis Cartilage* 9 Suppl. A:48-54
- Westphal JR, Willems HW, Schalkwijk CJ, Ruiter DJ, De Waal RM 1993
Characteristics and possible function of endoglin, a TGF- β binding protein. *Behring Inst Mitt,* (92):15-22
- Woo SL, Maynard J, Butler J 1987
Ligament, tendon and joint capsule insertions to bone. Injury and repair of the musculoskeletal soft tissue. S. Woo, Savannah GA, Academy of Orthopaedic Surgeons: 129-166
- Würzler-Hauri CC, Dourte LM, Baradet TC, Williams GR, Soslowsky LJ 2007
Temporal expression of 8 growth factors in tendon-to-bone healing in a rat supraspinatus Model. *J Shoulder Elbow Surg* Vol. 16, Nr. 5S 198-203
- Wozney JM, 2002
Overview of Bone Morphogenetic Proteins. *SPINE* Volume 27; Number 165, 52-58

- Yamamoto A, Takagishi K, Osawa T, Yanagawa T, Nakajima D, Shitara H, Kobayashi T 2010
Prevalence and risk factors of a rotator cuff tear in the general population. *J Shoulder Elbow Surg* 19, 116-120
- Yamaguchi K, Ditsios K, Middleton WD, Hildebolt CF, Galatz LM, Teefey SA 2006
The demographic and morphological features of rotator cuff disease. *J Bone Joint Surg* 1699-1704
- Yanagisawa K, Hamada K, Gotoh M, Tokunaga T, Oshika Y, Tomisawa M, Hwan Lee Y, Handa A, Kijima H, Yamazaki H, Nakamura M, Ueyama Y, Tamaoki N, Fukuda H 2001
Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the subacromial bursa is increased in patients with impingement syndrome. *J Orthop Res* 19:448-455
- Yang S, Park HS, Flores S, Levin SD, Makhsous M, Lin F, Koh J, Nuber G, Zhang LO 2009
Biomechanical analysis of bursal-sided partial thickness rotator cuff tear. *J Shoulder Elbow Surg* 18(3):379-85
- Yokota A, Gimbel JA, Williams GR, Soslowsky LJ 2005
Supraspinatus tendon composition remains altered long after tendon detachment. *J Shoulder Elbow Surgery* 12:72-78
- Yoshikawa H, Nakase T, Myoui A, Ueda T 2004
Bone morphogenetic proteins in bone tumors. *J Orthop Sci* 9:334-340
- Yu Y, Bliss JP, Bruce WJM, Walsh WR 2007
Bone Morphogenetic Proteins and Smad Expression in Ovine tendon-bone healing. *Arthroscopy* 2007, Feb;23(2):205-10
- Zhu, JY, Zhu QS, Hashimoto T, Nobuhara K 2004
Morphological changes of roof of the subacromial bursa in patients with rotator cuff tear
Chin J Traumatol 7(4):205-209

9. Anhang

9.1. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Erarbeitung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. R. Kinne

C. Müller

Ch. Mollenhauer,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Plauen, Dezember 2012

9.2. Lebenslauf

Eckert-Veit, Amanda

geb. am 10.06.1981 in Freiberg (D)

Grundschule:

September 1988-1992

Grundschule Oederan

Gymnasium:

August 1992-Juli 2000

Gymnasium Oederan

Universität:

Oktober 2000-Oktober 2006
Universität Jena (D)

Medizinstudium an der Friedrich-Schiller-

September 2002

Physikum

August 2003

1. Staatsexamen

August 2005

2. Staatsexamen

Oktober 2006

3. Staatsexamen

Berufstätigkeit:

seit 02.01. 2007

Assistenzärztin für Urologie am HELIOS
Vogtlandklinikum Plauen
Stationsärztin

seit Juli 2011

seit 18.12.2012

Fachärztin für Urologie (erfolgreicher
Abschluss der Facharztprüfung)

9.3. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei der Klinik für Orthopädie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, dem Rudolf-Elle-Krankenhaus, für die Überlassung des Themas der Dissertation und allen bedanken, die mich in die theoretische und klinische Problematik eingearbeitet haben und zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. R. Kinne danke ich ganz besonders für seine ausdauernde und hilfreiche Betreuung mit konstruktiver Kritik bei der Bearbeitung des Manuskriptes und Herstellung des Bezuges zwischen gewonnenen Ergebnissen und der klinischen Problematik und sein persönliches Engagement.

Ein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern und Doktoranden im Forschungslabor des Rudolf-Elle-Krankenhauses, v.a. Fr. C. Müller, J. Schoenburg, die mir so oft mit Rat zu Seite standen. Sehr dankbar bin ich Herrn Dr. Layer und Herrn Dr. Sander für die statistische Auswertung der Daten und aufmunternden Worte, sowie Herrn CA Dr. Wetzel bei der Auswertung der Röntgenbilder.

Ein ganz großes Danke gilt meinen Eltern, meinem Mann Sebastian und meinem Bruder Amadeus. Sie haben mich mit ihrer unsagbaren Geduld, ihrem Verständnis und auch hilfreichen Kritik unterstützt, nicht nur bei der Arbeit sondern auch beim Erlernen und Ausüben meines wunderbaren Berufes.

Op-Begleitschein:


Patientendaten 280 855

Anamnese 3 Jahre 49f

Dauer der Beschwerden

adäquates Trauma (event. sonst. Besonderheiten) ☐ ja ☒ nein

OP-Datum ☐ ja ☒ nein



Entnahmestelle

makroskop. Grad der Bursitis ☐ keine ☒ mäßig ☐ deutlich

Größe der Ruptur-komplette Rotatorenmanischertenruptur: Supraspinatussehnenruptur

Rupturlokalisation ☒ SSP ☒ IPS ☐ SSC ☐ RI

Rupturgröße 3 x 2 cm

Sehnenränder ☐ abgerundet ☐ aufgefasert

Sehnenretraktion Paré ☐ I ☒ II ☐ III

Knöchern subacrom. Enge ☐ keine ☒ mäßig ☐ deutlich

Ruptur 3.8. 855

